



FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

Tesina presentada para obtener el grado académico de
LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

DETECCION DE HIBRIDOS ENTRE *CULEX PIFIENS* Y *CULEX QUINQUEFASCIATUS*
(DIPTERA: CULICIDAE) EN LOCALIDADES DEL NORESTE DE LA PROVINCIA DE
LA PAMPA, ARGENTINA.

FERNANDO DIEZ

SANTA ROSA (LA PAMPA)

ARGENTINA

2011

Esta Tesina es presentada como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Licenciado en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de La Pampa y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad ni en otra Institución Académica. Se llevó a cabo en el laboratorio de la cátedra de Biología de Invertebrados II, dependiente del Departamento de Ciencias Naturales, durante el período comprendido entre el 11 de marzo de 2010 y 12 de abril del 2011, bajo la dirección de Gustavo C. Rossi y la codirección de Estela M. Quirán.

Agradecimientos

Le agradezco a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UNLpam), a mi director de tesina Gustavo C. Rossi (CEPAVE, Centro de Estudios Parasitológico y Vectores Entomológicos) y codirectora Estela M. Quirán, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UNLpam). Además a Barby por escucharme y Julián por colaborar en la cría de Culicidos. Por último a mi familia por el apoyo a lo largo de toda la carrera.

Fecha: 12 /04 /2011

Firma:

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA.

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA.

Resumen

Los mosquitos son importantes desde el punto de vista de salud pública, debido a su desempeño como vectores y reservorios de arbovirus, muchas especies vehiculizan diferentes protozoarios, nematodos y virus que provocan diferentes enfermedades en animales, causando pérdidas económicas y poniendo en riesgo la vida humana. Las enfermedades transmitidas por los individuos pertenecientes al complejo *Culex pipiens* y que hasta el momento fueron aislados sus respectivos patógenos son: diferentes tipos de filariasis linfáticas; en Argentina se detectó *Dirofilaria immitis* en *Culex pipiens* y *Culex quinquefasciatus* con Encefalitis de San Luis. Además en otras partes del mundo se aislaron partículas virales de Encefalitis de Japón, y Virus del Nilo Occidental. También fue detectado en esta especie *Plasmodium relictum*, causante de la enfermedad Malaria aviar. El método más efectivo para combatir estas enfermedades es por medio del control de vectores. Así conocer la distribución biogeografía de este complejo es de vital importancia para luego poder llevar a cabo planes de manejo. El presente trabajo tiene como objetivo detectar la presencia de los integrantes del complejo, mediante los índices morfométricos DV/D e Índice del Sifón, en cinco localidades de la provincia de La Pampa, Santa Rosa, Winifreda, Eduardo Castex, General Pico y Realicó. Además de obtener en condiciones de laboratorio híbridos entre *Culex pipiens* y *Culex quinquefasciatus*. Se detectó la presencia de *Culex pipiens*, primer registro de esta especie para la provincia, *Culex quinquefasciatus* e híbridos entre ambos. Se registró autogamia por parte de cohortes de *Culex pipiens* e híbridos.

Abstract

Mosquitoes are important from the standpoint of public health due to his role as arbovirus vectors and reservoirs, many species of mosquitoes transmit protozoa different, nematodes and viruses that cause various diseases in animals, causing economic losses and threaten human life. Diseases transmitted by persons belonging to *Culex Pipiens* complex and their respective pathogens were isolated until now are: different types of lymphatic filariasis, in Argentina *Dirofilaria immitis* was detected in *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus* with St. Louis encephalitis. Also in other parts of the world, viral particles of Japanese encephalitis and West Nile Virus were detected. In addition in this species, *Plasmodium relictum* was detected, disease causing avian malaria. The most effective method to combat these diseases through vector control. Thus knowing the biogeography distribution of this complex is of vital importance to later carry out management plans. This study aims to detect the presence of members of the *Culex Pipiens* complex, with the Morphometric Indexes: DV/D and Siphon Index in five localities in the La Pampa province , Santa Rosa, Winifreda, Castex, General Pico and Realicó. Besides getting in conditions laboratory hybrids between *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus*. It detected the presence of *Culex pipiens*, new record to the province, *Culex quinquefasciatus* and hybrids between them. Autogeny was recorded by cohorts of *Culex pipiens* and hybrids.

INDICE

1 INTRODUCCION	1
<u>1.1 Características generales de Dípteros</u>	1
<u>1.2 Morfología externa de Culicidae</u>	3
<u>1.2.1 Importancia sanitaria de Culicidae</u>	11
<u>1.3 Complejo <i>Culex pipiens</i></u>	11
<u>1.3.1 Miembros y distribución del complejo <i>Culex pipiens</i></u>	11
<u>1.3.2 Caracteres etológicos y ecofisiológicos</u>	13
<u>1.3.3 Caracteres morfológicos</u>	14
<u>1.3.4 Complejo <i>Culex Pipiens</i> en Argentina</u>	17
2 HIPOTESIS	18
3 OBJETIVOS	18
<u>3.1 OBJETIVO ESPECIFICO</u>	18
<u>3.2 OBJETIVOS GENERALES</u>	18
4 MATERIALES Y METODOS	19
<u>4.1 Área de muestreo</u>	19
<u>4.2 Metodología de captura</u>	21
<u>4.3 LARVAS</u>	24
<u>4.3.1 Cría</u>	24
<u>4.3.2 LARVA: Obtención del Índice del Sifón de larvas</u>	25
<u>4.4 ADULTO: Obtención del Índice Morfométrico de la genitalia masculina</u>	26
<u>4.4.1 Prueba de Cruzamiento en cámara de cría</u>	31
5 RESULTADOS	33
<u>5.1 Búsqueda, captura y caracterización</u>	33
<u>5.2 Caracteres etológicos observados</u>	35
<u>5.3 Caracteres morfológicos</u>	35
<u>5.3.1 Índice DV\D de adultos colectados en campo</u>	35
<u>5.3.2 Índice del sifón de larvas colectadas en campo</u>	36
<u>5.4 Cruzamientos de Prueba</u>	37
<u>5.4.1 Análisis estadístico del índice I.S</u>	37
<u>5.4.2 Análisis estadístico del índice DV\D</u>	41
6 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	45
<u>6.1 Detección de autogenia</u>	45
<u>6.2 Detección del complejo <i>Culex Pipiens</i> en el noreste de la provincia de La Pampa</u>	45
<u>6.3 Pruebas de cruzamiento híbridos</u>	46
<u>6.4 Caracteres morfológicos</u>	47
7 BIBLIOGRAFIA	48

DETECCION DE HIBRIDOS ENTRE *CULEX PIPIENS* Y *CULEX QUINQUEFASCIATUS* (DIPTERA: CULICIDAE) EN LOCALIDADES DEL NORESTE DE LA PROVINCIA DE LA PAMPA, ARGENTINA

1 INTRODUCCION

1.1 Características generales de Dípteros

Los vulgarmente llamados mosquitos, corresponden a insectos del orden Dípteros y de la familia Culicidae (Hexapoda: Diptera). Los Dípteros adultos presentan externamente una cabeza fuertemente esclerotizada con respecto al resto del cuerpo y ambas regiones se unen por un cuello membranoso y flexible; poseen un par ojos compuestos que pueden ser holópticos o merópticos según el grupo; las antenas se encuentran en los márgenes de éstos y pueden ser aristadas o filiformes. La región del vertex puede presentar tres ocelos medios dispuestos en un tubérculo y el occipucio puede ser aplanado o cóncavo.

El aparato bucal está adaptado para succionar y forma una probóscide o rostro que puede ser más o menos elongada y a veces incorpora tanto el labro como el clípeo, hay varios tipos de piezas bucales, cuya forma y función dependen del hábito alimenticio del grupo, siendo chupador, cortador-chupador, masticador-lamedor y picador-suctor.

Presentan modificaciones en la región torácica, el protórax y metatórax están fuertemente reducidos y el mesotórax se presenta más desarrollado y alargado, en él se acomodan los músculos del vuelo del único par de alas funcionales presentes en estos organismos. El pronoto está claramente dividido en pronoto anterior y pronoto posterior, el primero forma más desarrollado en familias como Tipulidae y Bibionidae, donde forma un estrecho collar. El mesotórax está representado dorsalmente en su totalidad por el escudo el cual puede estar dividido por una sutura en “V” en prescudo y escudo, por ejemplo en Tipulidae, en el Suborden Nematocera y algunos Orthorrhapha, se diferencia un esclerito paraterguito que es un vestigio del verdadero prescutelo. El mesopleuron se encuentra dividido verticalmente por la

sutura pleural que comienzan en la base de las alas hasta las coxas y puede presentar varios escleritos. Las alas funcionales se encuentran en el mesotórax, son membranosas e hialinas, en cambio las del metatórax se encuentran reducidas a estructuras en forma de clava denominadas salterios. Presentan varios escleritos: los más conspicuos son la tégula situados en la base del margen anterior y adyacente a éste, se encuentra la placa humeral, presenta además tres lóbulos, el superior, inferior y el álula o lóbulo axilar donde se diferencia la incisión axilar que interviene en el plegado del ala; la venación es diferente para cada género y especie y la disposición de macroquetas y microquetas son de valor taxonómico a nivel genérico. Las patas presentan diversidad de formas: básicamente están compuestas por cuatro segmentos, la coxa que generalmente se encuentra fusionada al pleuron; el fémur, tibia y tarso, el cual generalmente está formado por cinco tarsómeros. El abdomen está poco esclerotizado y en algunas familias puede ser telescopable de los segmentos terminales. Las estructuras más prominentes son los espiráculos que se encuentran en los márgenes laterales de cada terguito abdominal, los orificios genitales, el ano y los cercos. Primitivamente los Dípteros presentaban 11 segmentos pero el segmento XI y X se fusionan para formar el proctiger y los grupos superiores de este orden hay una tendencia a fusionarse el segmentos I y II.

Los huevos generalmente pueden ser puestos en grupos, inmersos dentro de una matriz gelatinosa o como en algunos Culícidos que los agrupan en masas regulares llamadas balsas en forma individual, generalmente presentan una pared pálida y delgada aunque también pueden presentar un corion ornamentado; dichos huevos son estructuras de resistencia con una viabilidad de hasta dos años en condiciones adversas.

Las larvas son generalmente ápodas pero en algunas familias pueden poseer pseudopodios, el cuerpo suelen ser alargado y cilíndrico y se las puede diferenciar según el desarrollo de su cabeza en eucéfalas, hemicéfalas y acéfalas. Pueden estar adaptadas para desarrollarse en diferentes ambientes tanto acuáticos como terrestres, presentan los tres segmentos torácicos fusionados y los ocho segmentos abdominales claramente visibles, además presentan quetotaxia de relevancia taxonómica a nivel específico, algunas especies presentan espiráculos tanto en el meso como en el metatórax, en algunos grupos acuáticos estos son rudimentarios y presentan papilas anales o branquias externas o respiran tomando aire del medio terrestre por medio de un sifón respiratorio en cuyo extremo distal se abre un espiráculo.

Las pupas en dípteros son generalmente inmóviles a excepción de Culicomorpha cuyas pupas son acuáticas y se desplazan por fuertes movimientos abdominales, en la mayoría de Nematocera y Orthorrhapha son obtectas (CSIRO, 1991).

1.2 Morfología externa de Culicidae

La familia Culicidae, pertenecientes al suborden Nematocera (Infraorden Culicomorpha), caracterizados por presentar antenas que marcan un dimorfismo sexual, en los machos las antenas son plumosas y en las hembras, son filiformes y están formadas por tres segmentos, el escapo que es corto; el pedicelo con el órgano de Johnston más desarrollado en machos y el flagelo compuestos por 13 flagelómeros, la presencia o ausencia, forma y número de setas en los flagelómeros, son caracteres específicos (Rossi *et al.*, 2002). En la región del vértex no presentan ocelos medios y el occipucio es cóncavo, en éste se encuentran escamas cuya morfología son de valor taxonómico, que pueden ser bifurcadas, erectas, claras, oscuras, etc. El aparato bucal es del tipo picador-suctor: el orden y forma en que se disponen estas piezas permiten que formen dos conductos, el conducto alimenticio y el conducto salival, el primero está delimitado dorsalmente por el labrum y ventralmente por la superposición de las mandíbulas, el segundo está formado por una fuerte depresión en la hipofaringe que se abre basalmente, por debajo de éste se encuentran las lacinias y su vez todas estas se encuentran recubiertas por el labium, que se comporta a modo de vaina (Fig.1), a cada lado de la probóscide se pueden visualizar dos palpos maxilares que en hembras son cortos (tanto como un cuarto o menos de la longitud de la probóscide) a excepción de machos donde es casi tan largo como la probóscide, los de ambos sexos constan de 5 palpómeros cada uno.

El protórax tiene un escaso desarrollo y el pronoto forma un par de lóbulos, los lóbulos anteprenotales (Fig. 2) cuyo tamaño es de valor taxonómico (Darsie, 1985), en cambio el pronoto posterior está menos desarrollado y generalmente se lo encuentra íntimamente asociado al mesonoto para formar el postpronoto.

En el mesotórax se pueden diferenciar varias zonas dentro del escudo, estas son: área antealar, área supralar, área preescutelar, además poseen hileras de cerdas que se encuentran en el centro del escudo llamadas cerdas acrosticales y en posición lateral presentan las cerdas dorsocentrales.

El mesopleuron que está comprendido por el mesanepisterno, el cual presenta el espiráculo mesotorácico, el área preespiracular, área postespiracular, mesanepisterno posterior y el mesokatepisterno. Las alas se encuentran en el mesotórax, un par funciona y el segundo atrofiado llamado halterio, la venación del ala presenta un dibujo particular, nombrando desde la región anterior hacia la posterior primero está la vena costa que comienza en la base del ala hasta el ápice, luego sigue la subcosta que recorre el ala paralelamente a la vena costa y se une a esta por delante de la zona media del ala, la vena radial comienza a la misma altura que la vena subcostal, esta se divide en la vena R1, que llega hasta el ápice alar, y la vena sector radial, esta última se divide en la vena R 2+3 y R 4+5, que a su vez la vena R 2+3 se divide en la vena R2 y R3, así como la vena R4+5 se divide en vena R4 y vena R5. Luego está la vena medial que se bifurca distalmente en la vena M 1+2 y vena M 3+4. Por debajo de la vena Medial se encuentra la vena Cubital la cual se ramifica en la vena Cubital 1 y Cubital 2 y por último sigue la Vena anal. Hay dos venas transversales la vena Radio medial y la vena Medio cubital, la primera se encuentra entre la vena R 4+5 y la Medial antes de la bifurcación de la medial y después de la radicación del sector radial y la mediocubital se encuentra entre la Medial y la Cubita 1 antes de la división de la Medial. Las células presente formadas por la venación del ala son: la célula costal, célula subcostal, las células radial 1, 2, 3 y 5, luego están las células Medial 2 y Medial 4, por último la células cubital 1 y cubital 2 (fig. 3). Las patas son delgadas y frágiles, están recubiertas de escamas y setas, que permiten discriminar entre diferentes géneros y/o especies, son constituidas por 5 segmentos que se unen al mesopleuron a partir de las coxas, éstas se articulan al fémur por medio de los trocánter, luego sigue la tibia que se une al tarso, este último está compuesto por 5 tarsómeros, el más distal de éstos lleva dos uñas y por debajo de las uñas presentan un par de almohadillas que son los pulvillos, sólo en algunos géneros.

El abdomen de los culícidos está formado por 10 segmentos débilmente esclerotizados, cada segmento está constituido por un terguito de posición dorsal que se expande brevemente hacia los laterales denominándose lateroterguito al del primer terguito, un esternito ventral y los laterales están cubierto por las membranas pleurales, las cuales le dan al abdomen la capacidad de expandirse cuando el mosquito ingiere sangre. Los segmentos abdominales comprendidos desde el segmento I hasta el VIII, inclusive, son visibles y los últimos dos segmentos se encuentran retraídos dentro del abdomen siendo los cercos las únicas estructuras conspicuas del segmento X en algunas especies (Rossi *et al.*, 2002). Estos segmentos se modifican para

constituir la genitalia, en los adultos machos en los cuales la morfología y estructura de dicha genitalia es muy importante para determinar especies y subespecies, está compuesta por tres estructuras dos gonocoxitos, son más o menos cilíndricos que flanquean al Protiger y el phallosoma, en vista dorsal se visualiza primero el Protiger y detrás al phallosoma. El gonocoxito presenta un lóbulo en posición superior del margen interno que se denomina lóbulo superior que presenta setas denominadas con letras, “a” para la seta más basal hasta la “h” para la seta apical, las que pueden o no estar todas presentes. Estas pueden variar en tamaño y forma que es propio de cada especie. Por último el gonocoxito presenta en su ápice el gonostilo, curvo y laminar, que a su vez termina en una estructura en forma de uña llamada garra del gonostilo. El Protiger está, formado por varias piezas, en su base presenta el tergo X, sobre éste descansa una estructura más o menos columnar denominada paraprocto, que en su base se expande lateralmente formando el brazo lateral basal y en el ápice presenta la corona del paraprocto, paralelamente la cara interna del paraprocto se encuentra el esclerito cercal. El phallosoma está compuesto por una pieza basal y sobre esta se sitúa el plato lateral el cual tiene prolongaciones fuertemente esclerotizadas que son variables de una especie a otra y se denominan brazo dorsal, brazos laterales y el brazo ventral, el nombre mismo da idea de la ubicación en que se encuentran en el plato lateral. Por último se encuentra el tergo IX que se presenta a modo de cinturón y se sujeta en la base de los dos gonocoxitos, la presencia de cerdas y lóbulos en este tergo es característico algunos géneros. En Fig. 4 se detallan las partes componentes de la genitalia de Culícidos, específicamente de *Culex pipiens*. (Bram, 1967; Edwards, 1920; Harbach *et al.*, 1986; Knight y Laffoon, 1971).

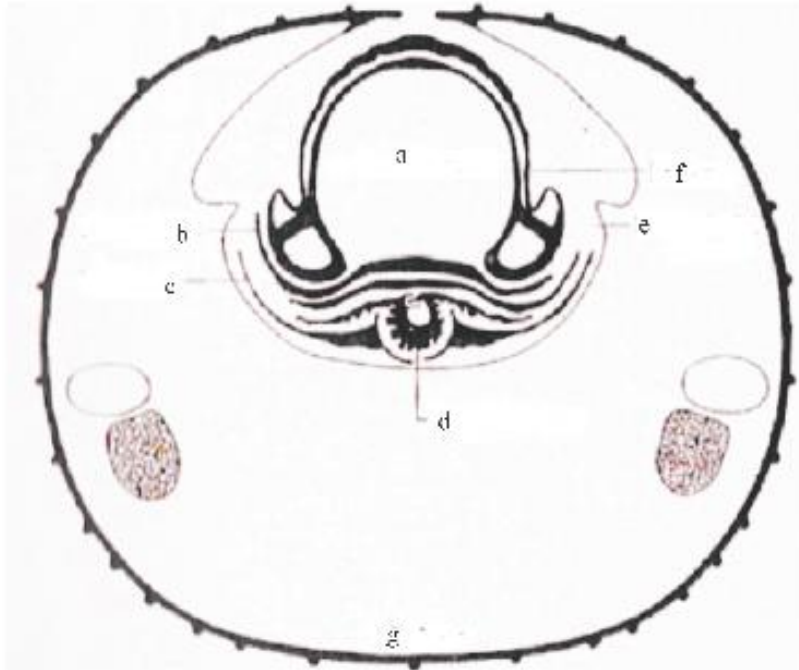
Las hembras para poder realizar la oviposición deben ingerir grandes cantidades de proteínas para poder generar el huevo. Satisfacen esta necesidad mediante la actividad hematofágica y cada especie tiene preferencia por un hospedador en particular, también pueden no presentar diversos hospedadores, en estos casos son consideradas especies generalistas (Almirón y Brewer, 1995). La elección de hábitat para realizar la postura de huevos, varía de una especie a otra así como la forma en la que realizan la oviposición, pueden ponerlos individualmente sobre el agua, como el género *Anopheles* o sobre superficies húmedas que sean propensas a inundarse y cuando esto ocurre recomienzan a desarrollarse el embrión y eclosionan, ya que cuando ponen los huevos comienza el desarrollo y se estaciona, la larva o embrión entra en aquiescencia o reposo cuando baja el tenor de humedad, esto es característico en los géneros *Aedes*, *Ochlerotatus* y *Psorophora* o pueden oviponer sobre la superficie del agua, en forma

individual (*Anopheles*) o en masas compactas de huevos llamadas balsas (género *Culex* y *Uranotaenia*), otros ponen los huevos adhiriéndolos a las raíces de plantas sumergidas (*Mansonia*, *Coquillettidia*). Los huevos son pequeños de unos 0.6 a 0.8 mm, variando el tamaño entre las especies e inclusive dentro de éstas y la cubierta es de color claro oscureciéndose con el pasar de las horas (Rossi *et al.*, 2002).

Una vez eclosionados los huevos, las larvas pasan por cuatro estadios en su desarrollo antes de alcanzar el estado de pupa, diferenciándose por su tamaño, además adquieren un desarrollo completo de las setas y del sifón respiratorio, estructuras utilizadas en la diferenciación específica e intraespecífica, por este motivo las descripciones de las larvas se basaran en las de cuarto estadio.

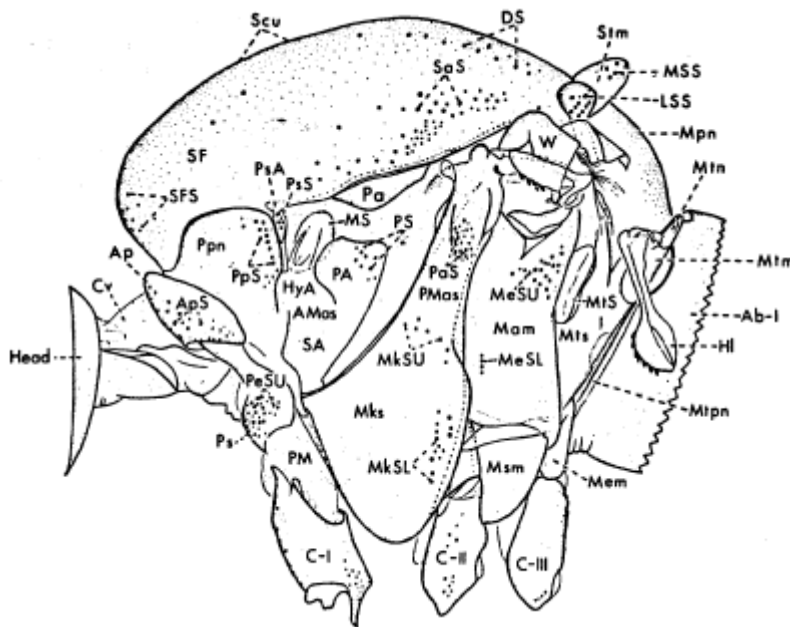
Las larvas presentan la cabeza fuertemente esclerotizada a diferencia del cuerpo, en posición ventral se encuentran las piezas bucales que están recubiertas de grandes setas, impidiendo diferenciar con claridad a la mandíbula, maxila y palpos, en posición ánterolateral a estas partes bucales se encuentran los cepillos bucales, ventralmente presenta el mentón y dorsalmente el labro. Las antenas varían en forma y tamaño, las que parten de la prominencia antenal. Las divisiones del tórax no son fácilmente diferenciables pero presentan pares de setas y/o espiculas únicas para el pro, meso y metatorax. El abdomen consiste en diez segmentos. En los ocho primeros segmentos no hay ninguna estructura diferenciada pero cada especie posee pares de setas que las caracterizan, los tres últimos segmentos están modificados de tal forma que intervienen en la respiración en el caso del segmento IX, en éste se observa el sifón de forma de cono con distintas variantes y en su mitad basal están presentes una serie de espinas llamadas pecten, faltando en algunos grupos, las cerdas laterodorsales posicionadas entre el dorso y los laterales, además en el extremo distal se abre el espiráculo con su aparato espiracular. En el segmento VIII lateralmente suele encontrarse el peine formado por una serie de espinas aserradas o no dependiendo del género.

En el segmento X, denominado segmento anal, se abre el poro anal rodeado de uno o dos pares de papilas anales, sobre este hay un esclerito prominente que se denomina silla de montar que pueden o no rodear completamente el segmento x y de un grupo de barras esclerotizadas llamadas red, parten las cerdas 4-X o brocha ventral que son un grupo de cerdas muy desarrolladas y vigorosamente esclerotizada (Darsie, 1985).



- a) Canal alimenticio.
- b) Mandíbula.
- c) Lacinia.
- d) Hipofaringe.
- e) Ranura Labial.
- f) Labrum.
- g) Labium.

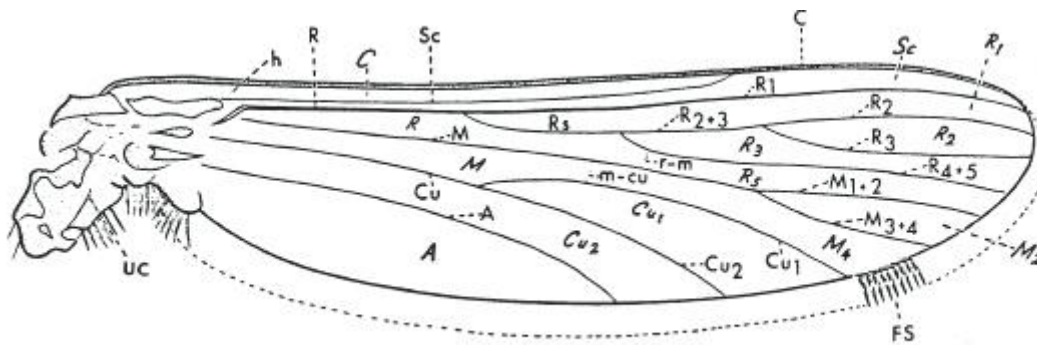
Fig. 1 Corte transversal de la probóscide. (CSIRO, 1991).



Ab-I- segmento abdominal I.
 AM as- mesanepisterno anterior.
 AP- antepronoto.
 APS- cerdas antepronotales.
 C-I- Coxa delantera.
 CII- Coxa media.
 CIII- Coxa posterior.
 CV- Cervix.
 DS- Cerda dorsocentral.
 HI- Halterio.
 HAY- Area hipostigial
 LSS- Cerdas escutelares laterales.
 Mam- Mesanepímeron.
 Mem- Metamero.
 MeSL- Cerdas mesanepimerales inf.
 Mesu- Cerdas mesanepimerales sup.
 MKs- Mesokatepisterno.
 MkSL- Cerdas mesokatepisternales inf.
 MkSU- Cerdas mesokatepisternales sup.
 MPn- Mesopostnoto.
 MS- Espiraculo mesotoracico.
 Msm- Mesomero.
 MSS- Cerdas escutelares medias.

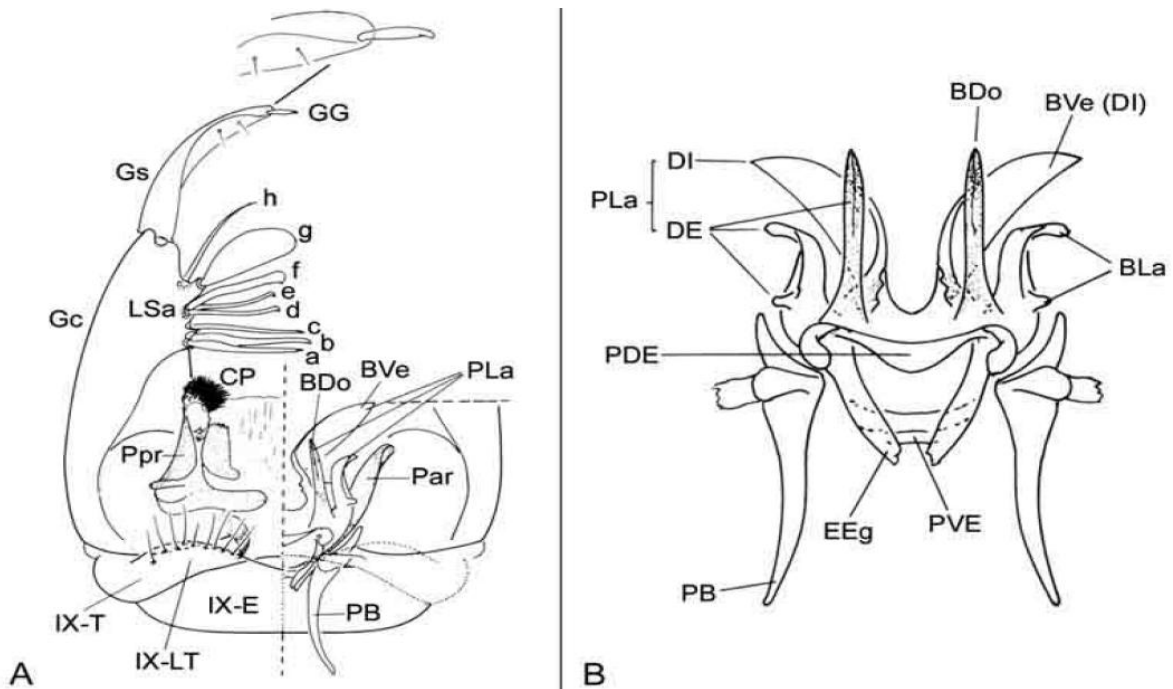
Mtm- Metepímero.
 Mtn- Metanoto.
 Mtpn- Metapostnoto.
 MtS- Espiráculo Metatorácico.
 Mts- Metepisterno.
 PA- Área postespiracular.
 Pa- Paraterguito.
 PaS- Cerdas prealares.
 PeSU- Proespisternales superiores.
 PM- Membrana postprocoxal.
 PMas- Mesanepisterno superior.
 Ppn- Postpronoto.
 PPS- Cerdas postpronotales.
 PS- Proepisterno.
 PsA- Prespiracular.
 PSS- Cerdas prespiraculares.
 SA- Área subespiracular.
 SaS- Cerdas supraalares.
 Scu- Escuto.
 SF- Fosa escutal.
 SFS- Cerdas de la fosa del escuto.
 stm- Escutelo.
 W- Ala.

Fig. 2 Vista lateral del tórax. Las siglas corresponden a las abreviaciones en inglés. (Darsie, 1985).



- | | |
|--|--|
| A- Vena anal. | m-cu- Vena transversal mediocubital. |
| A- Célula anal. | R- Vena radial. |
| R- Vena radial. | R- Célula radial. |
| R- Célula radial. | R ₁ - Vena R ₁ . |
| C- Vena Costa. | R ₁ - Célula R ₁ . |
| C- Célula Costa. | R ₂ - Vena R ₂ . |
| Cu- Vena cubital. | R ₂ - Célula R ₂ . |
| Cu ₁ - Vena Cu ₁ . | R ₂₊₃ - Vena R ₂₊₃ . |
| Cu ₁ - Célula Cu ₁ . | R ₃ - Vena R ₃ . |
| Cu ₂ - Vena Cu ₂ . | R ₃ - Célula R ₃ . |
| Cu ₂ - Célula Cu ₂ . | R ₄₊₅ - Vena R ₄₊₅ . |
| FS- Franja de escamas. | R ₅ - Célula R ₅ . |
| h- Vena transversal humeral. | r-m- Vena transversal radiomedial. |
| M- Vena medial. | Rs- Vena sector radial. |
| M- Célula medial. | Sc- Vena subcosta. |
| M ₁₊₂ - Vena M ₁₊₂ | Sc- Célula subcosta. |
| M ₂ - Célula M ₂ . | UC- Caliptra superior. |
| M ₂₊₃ - Vena M ₂₊₃ . | m-cu- Vena transversal mediocubital. |
| M ₄ - Célula M ₄ . | |

Fig. 3 Vista dorsal del ala. Las siglas corresponden a las abreviaciones en inglés. (Darsie, 1985).



a-h- Cerdas del Lsa.
 Bla- Brazo lateral.
 BVe- Brazo ventral
 Bdo- Brazo dorsal.
 CP- Corona del paraprocto.
 EEg- Aedeago.
 Gc- Gonocoxito.
 GG- Uña del gonostilo.
 Gs- Gonostilo.
 PB- Placa basal.

Pla- Placa lateral.
 DI- División interna.
 DE- División externa.
 LSa- Lobulo subapical del gonocoxito.
 Par- Parámero.
 PDE- Puente dorsal del aedeago.
 PPr- Paraprocto.
 PVE- Puente ventral del aedeago.
 IX-E- Esternito.
 IX-LT- Lateroterguito.

Fig.4 A) Esquema de la genitalia masculina de *Culex pipiens*. B) Esquema del Falosoma. (Pascual, 2004).

1.2.1 Importancia sanitaria de Culicidae

Los mosquitos son importantes desde el punto de vista de salud pública, debido a su desempeño como vectores y reservorios de arbovirus, además muchas especies vehiculizan diferentes protozoarios, nematodos y virus que provocan diferentes enfermedades en animales, causando pérdidas económicas y poniendo en riesgo la vida humana ya que en muchas ocasiones infectan mascotas que se encuentran en constante relación con los hombres por ejemplo: la encefalitis equina del este, el gusano del corazón o Canine heartworm, enfermedad ocasionada por *Dirofilaria immitis* y transmitida por *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus*, *Ochlerotatus fluviatilis* y *Ochlerotatus scapularis* (Vezzani *et al.*, 2006). La gran diversidad de especies de esta familia, permite que haya una alta variedad de hospedadores, influyendo en la transmisión de enfermedades virales y parasitarias. Además, la compatibilidad génica por parte de ciertas especies de culícidos para con determinadas cepas virales, diversidad de hábitat y sumado a esto, el carácter etológico hematofágico generalista en el caso de las hembras, son unos de los caracteres más importantes desde el punto epidemiológico. (Forattini *et al.*, 1987; Rossi y Almiron, 2004; Almirón y Brewer, 1995; Almirón y Brewer, 1996; Service, 1996; Vezzani y Carbajo, 2008).

1.3 Complejo *Culex pipiens*

1.3.1 Miembros y distribución del complejo *Culex pipiens*

El complejo *Culex pipiens* es activamente estudiado por su potencial actividad como vector de diferentes enfermedades por lo que se les confiere una gran importancia médica y veterinaria (Tabla 1), dado que suelen habitar en los mismo lugares que el hombre, son especies llamadas domiciliarias como *Ae. aegypti*.

Las enfermedades transmitidas por los individuos pertenecientes a este complejo y que hasta el momento fueron aislados sus respectivos patógenos son diferentes tipos de

filariasis linfáticas; en Argentina se detectó *Dirofilaria immitis* en *Culex pipiens* (Vezzani *et al.*, 2006) y *Culex quinquefasciatus* con Encefalitis de San Luis. Además en otras partes del mundo se aislaron partículas virales de Encefalitis de Japón, Virus del Nilo Occidental, y Virus del oeste. También fue detectado en esta especie *Plasmodium relictum*, causante de la enfermedad Malaria aviar.

El complejo Pipiens está formado por seis miembros alrededor del mundo, *Culex pipiens pipiens*, el cual está representado por dos formas *pipiens* y *molestus*, distribuidos Europa, norte y sur de África, áreas montañosas de Kenya, áreas no tropicales de Asia, Australia y América del Norte a partir de latitud 39° hacia el norte (Vinogradoba, 2003) y en América del Sur entre las latitudes 35° a 50° (Almiron *et al.*, 1995). *Culex pipiens quinquefasciatus* está presente en áreas tropicales y subtropicales de África, norte y sur de América, sureste de Asia y Australia. *Culex pipiens pallens* se encuentra donde las distribuciones de *Culex pipiens pipiens* y *Culex pipiens quinquefasciatus* se superponen y esta condición se da en América del Norte entre las latitudes 36° hasta 39°, en China entre las latitudes 28°-32°, en la Argentina existen escasos estudios al respecto. *Culex torrentium* está presente en el este de la Región Paleártica, además en Europa y algunas zonas de Asia y *Culex vagans* habita, Corea, Japón sur este de Rusia (Vinogradoba, 2003). Desde un punto de vista general el Complejo *Culex* Pipiens es considerado cosmopolita.

Tabla 1. Capacidad vectorial del Complejo *Culex* Pipiens en la Argentina.

<i>Culex quinquefasciatus</i>	SLEV	1978	Santa Fe	Aislamiento	Mitchell <i>et al.</i> , 1985
<i>Culex quinquefasciatus</i>	SLEV	2002, 2003, 2005	Córdoba	Aislamiento. Detección molecular	Diaz <i>et al.</i> , 2006; 2010
<i>Culex pipiens</i>	<i>Dirofilaria immitis</i>	2006	Buenos Aires	Detección a microscopio óptico.	Vezzani <i>et al.</i> , 2006

1.3.2 Caracteres etológicos y ecofisiológicos

Los diferentes componentes del complejo *Culex Pipiens* se los puede diferenciar por una serie de caracteres etológicos y ecofisiológicos, que les brindan ventajas adaptativas en los ambientes en los que habitan, unas de estas características es la capacidad de entrar en diapausa, que se denomina heterodínamos y la condición opuesta es llamada homodínamos, la cual consiste en la reducción de la actividad metabólica, disminución del desarrollo ovárico por lo tanto una caída de la actividad hematofágica e incrementa gradualmente la acumulación de reservas de cuerpos de grasa de hasta un 66% del peso seco. Mediante diferentes cruzamientos de prueba se llegó la conclusión de que la diapausa es un carácter recesivo o sea que no se manifiesta en la F1 y lo hace en baja proporción en la F2, fue demostrado para híbridos entre *Culex pipiens* forma *pipiens* y *Culex pipiens* forma *molestus* (Vinogradova, 2003). En consecuencia, la diapausa actuaría como un factor de aislamiento reproductivo entre ambas formas, ya que al no poder entrar en diapausa, la F1 estaría destinada a morir con las temperaturas bajas del invierno. Otros caracteres que se pueden apreciar en las diferentes formas y grupos del complejo son:

- 1) Autogenia: capacidad de realizar la oviposición y generar el corion sin la ingesta previa de sangre de un huésped. Las proteínas necesarias son obtenidas de reservas generadas a partir de la alimentación en el estado de larva. La anautogenia es cuando las hembras necesitan alimentarse de sangre previo a la oviposición.
- 2) Estenogamia: capacidad de aparearse en espacios reducidos.
- 3) Eurigamia: la necesidad de espacios amplios para poder llevar a cabo el apareamiento.
- 4) Ornitofilia: preferencia por aves para realizar la ingesta de sangre.
- 5) Antropofilia: preferencia por la sangre humana.

Tab. 2 Características de los miembros del Complejo *Culex Pipiens*. (Vinogradoba, 2003)

	Autogenia	Stenogamia- Eurygamia	Diapausa	Antropofilia	Macho DV\D	Larva índice del sifón
<i>C. pipiens pipiens</i>	-	e	+	+	< 0,2	>4,7
f. <i>pipiens</i>				-		
f. <i>molestus</i>	+	s	-	+		<4,5
<i>C. p.</i>	-	s	-	+	>0,4	<3,5
<i>quinquefasciatus</i>						
<i>C. p. pallens</i>	-	e	+	+	0,2-0,4	4
<i>C. p. australicus</i>	-	e	+	-		
<i>C. torrentium</i>	-	e	+	-		6-7
<i>C. vagans</i>	-	e	+	+		

1.3.3 Caracteres morfológicos

Si bien los integrantes del complejo *Culex Pipiens* pueden ser diferenciados por una sustancial cantidad de caracteres etológicos y ecofisiológicos, también se lo puede hacer por medio de características morfológicas, calculando índices morfométricas. Las medidas más utilizadas son tomadas sobre dos estados diferentes de desarrollo de individuos del complejo, la primera es el índice del sifón (I.S.), el cual consta de la relación entre el largo y el ancho del sifón (largo/ancho), el largo del sifón se mide desde la base de este hasta el ápice, sin tener en cuenta las valvas y el ancho se mide aproximadamente en porción medial del sifón donde la curvatura es mayor (Brogdon, 1981, 1984). Las mediciones se deben realizar sobre el cuarto estadio larval, ya que en los otros estadios las diferencias del I.S., que permiten identificar a *Culex pipiens*, *Culex quinquefasciatus* y sus híbridos, se ven disimuladas por la variación del ancho del sifón. Actualmente la obtención de esta medida,

ancho se efectúa sobre la base del sifón, arrojando datos concluyentes para discriminar los integrantes del complejo, a diferencia de la técnica utilizada por Brogdon, 1981, 1984, en esta las mediciones del ancho del sifón, las ejecutaba sobre la porción medial del sifón, (Pascual, 2004). Los especímenes que presenten valores 4.3 o mayores para el I. S. se los clasifica como *Culex pipiens* y los que tomen valores 3.4 o menores para el I. S. son identificados como *Culex quinquefasciatus*, los híbridos serán todos aquellos con I.S menores de 4.3 y mayores de 3.4 sin incluir estos valores extremos. Estas medidas son aproximadas ya que corresponde a datos de la literatura, los que pueden variar según los autores y regiones, (a partir del presente trabajo se intentara obtener datos fidedignos para la Argentina).

Otra característica morfológica utilizada en la identificación de los miembros del complejo *Culex pipiens* es el índice morfométrico DV/D el cual consta de la relación entre la distancia del brazo dorsal al brazo ventral (DV) y la distancia entre los brazos ventrales (DV/D), estas estructuras se encuentran en los platos laterales del phallosoma, los ejemplares que presentan valores para la relación DV/D de 0.2 o menos, se los considera *Culex pipiens*, los que tengan índices de 0.4 o mayor son identificados como *Culex quinquefasciatus* y los valores de índices comprendidos entre 0.2 y 0.4 son clasificados como formas híbridas. Estas medidas son aproximadas ya que corresponde a datos de la literatura, los que pueden variar según los autores y regiones, (a partir del presente trabajo se intentara obtener datos fidedignos para la Argentina). (Jakob *et al.*, 1980a; Jakob *et al.*, 1980b; Jakob *et al.*, 1980c; Jakob y Francy, 1984; Vinogradova, 2003). Estos índices son los más utilizados para poder discriminar las formas híbridas entre *Cx. pipiens* y *Cx. quinquefasciatus* (Fig. 5), pero además hay otras técnicas para hacerlo, puede ser por medio frecuencia alelica de loci, en dicha técnica amplifican con PCR un determinado loci, produciendo fragmentos de diferentes longitudes de ADN y que son característicos para cada uno de los integrantes del complejo *Culex Pipiens*, por ejemplo los primers ACEquin, ACEpip y B1246s producen un fragmento de 610-pb in *Cx. pipiens* , un fragmento de 274-pb en *Cx. quinquefasciatus* y produce los dos en híbridos. También por análisis en la morfología de las nervaduras del ala de ejemplares hembras, en esta técnica se marcan puntos en las bifurcaciones de las nervaduras y en las terminaciones de estas, luego

son analizadas las relaciones del largo de la venación y distancias entre dichas bifurcaciones por medio de fotografía digital (Antunes de Morais *et al.*, 2010).

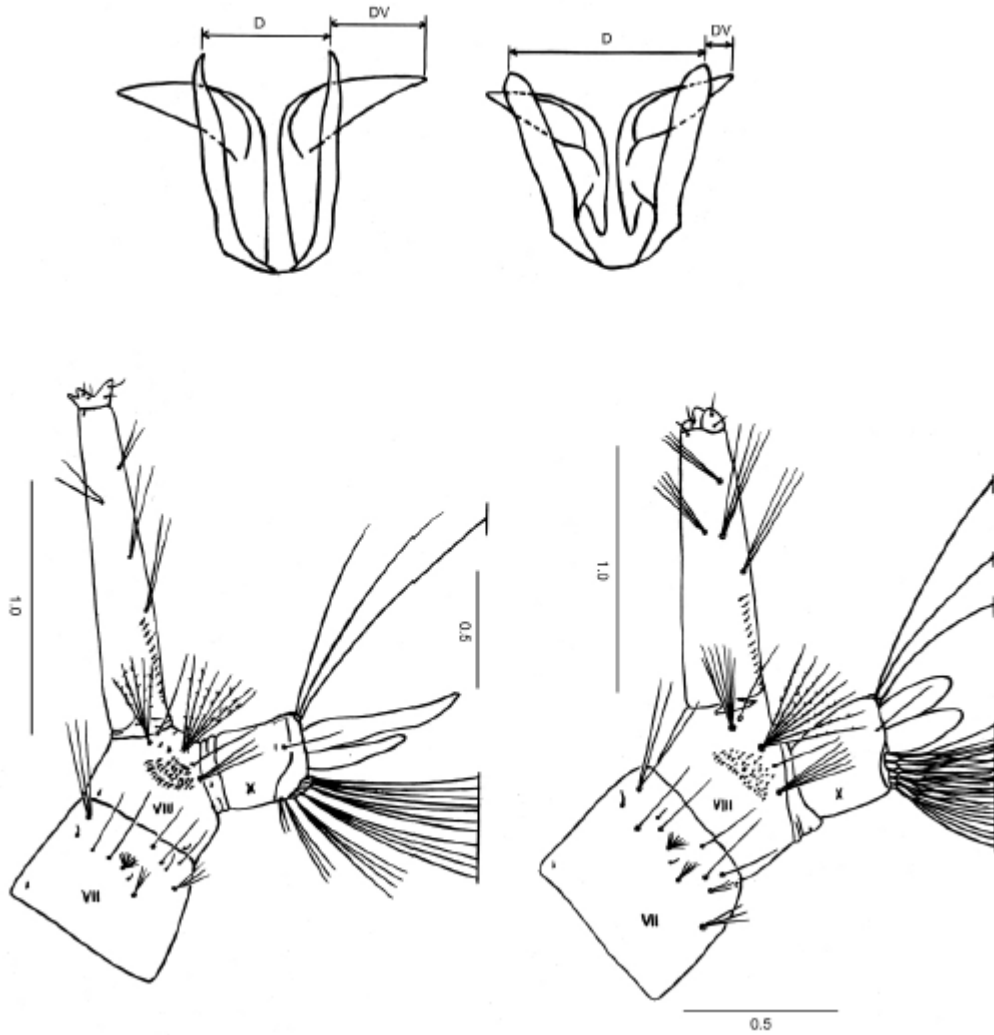


Fig. 5 A) Genitalia *Culex pipiens quinquefasciatus*. B) Genitalia *Culex pipiens pipiens*. C) Sifón *Culex pipiens pipiens*. D) Sifón *Culex pipiens quinquefasciatus*. (Vinigradoba, 2003).

1.3.4 Complejo *Culex Pipiens* en Argentina

En la Argentina están presentes solo dos integrantes miembros del complejo *Culex Pipiens*, *Cx. quinquefasciatus* y *Cx. pipiens*, aunque los límites de su distribución no están totalmente claros, si se traza una línea imaginaria que corre por el límite norte de la provincia de Buenos Aires hasta el sur de San Juan, *Culex quinquefasciatus* se encuentra al norte de ésta y *Culex pipiens* al sur. El primero está citado para las provincias de Buenos Aires, Catamarca, Chaco, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, La Rioja, Misiones, Jujuy, Salta, Santa Fe, Santiago del Estero y Tucumán. *Culex pipiens* en cambio se encuentra citado en las provincias de Buenos Aires, Mendoza, San Luis, San Juan, Río Negro y Chubut (Mitchell *et al.*, 1984). Así el centro del país es una zona de solapamiento entre ambas especies y ocurrencia de formas híbrida, ya que estas fueron detectadas en Córdoba, en la localidad de Rosario, (Santa Fe) y La Plata, Buenos Aires (Antunes de Morais *et al.*, 2010). En la provincia de La Pampa no hay registros previos de *Culex pipiens*; pero se lo detectó en la localidad de 9 de Julio (Buenos Aires) (Almirón *et al.*, 1995), ciudad con una similar ubicación latitudinal que Santa Rosa (La Pampa). El único registro para la provincia de La Pampa de *Culex quinquefasciatus* fue en mayo de 1986 (Carpintero y Leguizamón, 2004), pero sin especificar ningún carácter morfológico como I.S o DV/V que permitiera corroborar a que integrante del complejo pertenecían los ejemplares capturados. Por este motivo y por la falta de trabajos de esta temática en La Pampa no se tiene conocimiento alguno de la presencia y/o distribución del complejo, pero muy probablemente sea una zona de introgregación debido a la detección de éstos en latitudes comprendidas dentro de esta provincia.

2 HIPOTESIS

- 1) No se detectara la presencia de *Culex quinquefasciatus* en las localidades muestreadas.
- 2) Se detectara la presencia de *Culex pipiens*.
- 3) No se detectara la presencia de híbridos entre *Culex quinquefasciatus* y *Culex pipiens* en las localidades muestreadas.
- 4) Será factible la obtención de híbridos en condiciones de laboratorio entre individuos de *Culex quinquefasciatus* y *Culex pipiens* si se hallan en forma natural en las zonas muestreadas.
- 5) Se podrá observar o no la presencia de autogenia en alguna de las cruzas a efectuarse.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

- 1) Detectar la presencia de híbridos entre *Culex pipiens* y *Culex quinquefasciatus* en el noreste de la provincia de la pampa.

3.2 Objetivos específicos

- 1) Determinar la presencia de *Culex quinquefasciatus*.
- 2) Determinar la presencia de *Culex pipiens*.
- 3) Obtener híbridos entre *Culex pipiens* y *Culex quinquefasciatus* laboratorio.
- 4) En caso de ser factible la obtención de híbridos en laboratorio, se intentará determinar a qué cruzamiento corresponden los híbridos capturados en las localidades muestreadas.
- 5) Detectar autogenia en las diferentes cruzas.

4 MATERIALES Y METODOS

4.1 Área de muestreo

El estudio se llevo a cabo entre los meses de Febrero y Marzo del 2010 en las localidades de Santa Rosa ($-36^{\circ} 37' 43''$, $- 64^{\circ} 17' 15''$), (Departamento Capital), Winifreda ($-36^{\circ} 13' 37''$, $- 64^{\circ} 13' 58''$) , (Departamento Conhelo), Eduardo Castex ($-35^{\circ} 54' 57''$, $- 64^{\circ} 17' 44''$) (Departamento Conhelo), General Pico ($-35^{\circ} 39' 42''$, $- 63^{\circ} 44' 49''$) (Departamento Maracó) y Realicó ($-35^{\circ} 1' 59''$, $- 64^{\circ} 14' 47''$) (Departamento Realicó), todas las localidades forman parte de la región noreste de la provincia de La Pampa, Argentina (Fig. 6), donde las precipitaciones en el mes de en Enero de 2010, fueron en promedio: 32,3 mm., para el mes de febrero fueron 131,4 mm. y en el mes de marzo fueron: 246.56 mm. Las precipitaciones acumuladas desde el mes de enero hasta el mes de marzo del mismo año fueron 458.2 mm. y la temperatura promedio fue de 28.26 °C. (Servicio Meteorológico Nacional).

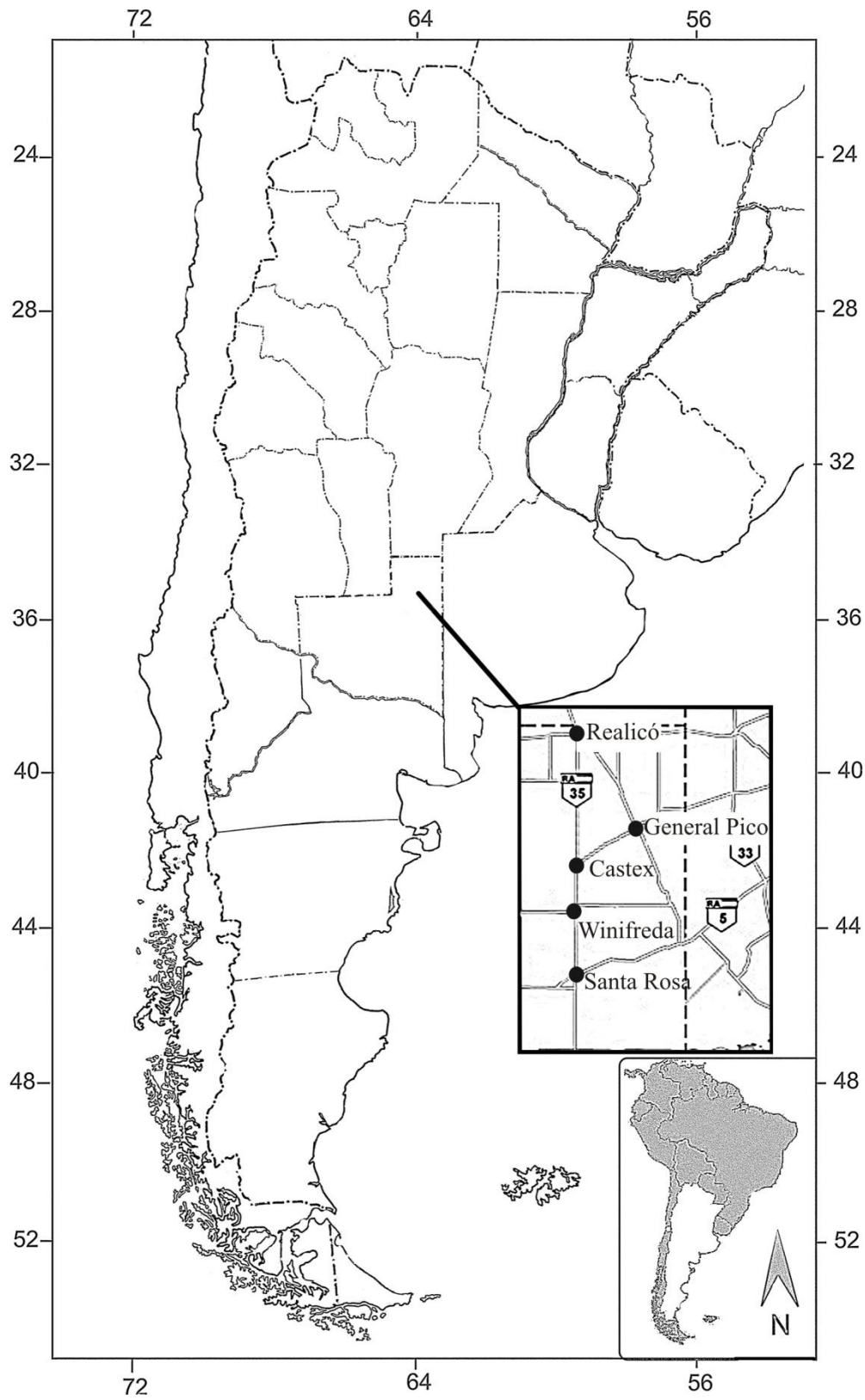


Fig. 6 Localidades de muestreo en la provincia de La Pampa, Argentina.

4.2 Metodología de captura

De cada localidad se eligieron dos depósitos de neumáticos y un cementerio municipal, (no privados), en este último se procedió con el vaciado de 5 recipientes pequeños como floreros, candelabros, etc. (imagen 1). En los depósitos de neumáticos, (Imagen 2) se utilizó el contenido que fue filtrado por medio de un colador cuadrado de 12 cm x 12 cm de lado (Imagen 3). El esfuerzo se midió por hora de filtrado de agua, el cual fue de 2 horas por depósito. El método del cucharón fue utilizado en la recolección de larvas que se encontraban en cuerpos de agua de gran volumen, de unos 200 l. o de mayor volumen (Imagen 4). Por otra parte, los adultos se capturaron de manera directa con frasco aspirador, Además, se recogieron balsas de huevos y fueron puestas en recipientes de 70 ml, rotulados, para ser trasladadas, junto a todos los especímenes del muestreo (Imagen 5), a la cámara de cría del laboratorio de la cátedra de Biología de Invertebrados II.

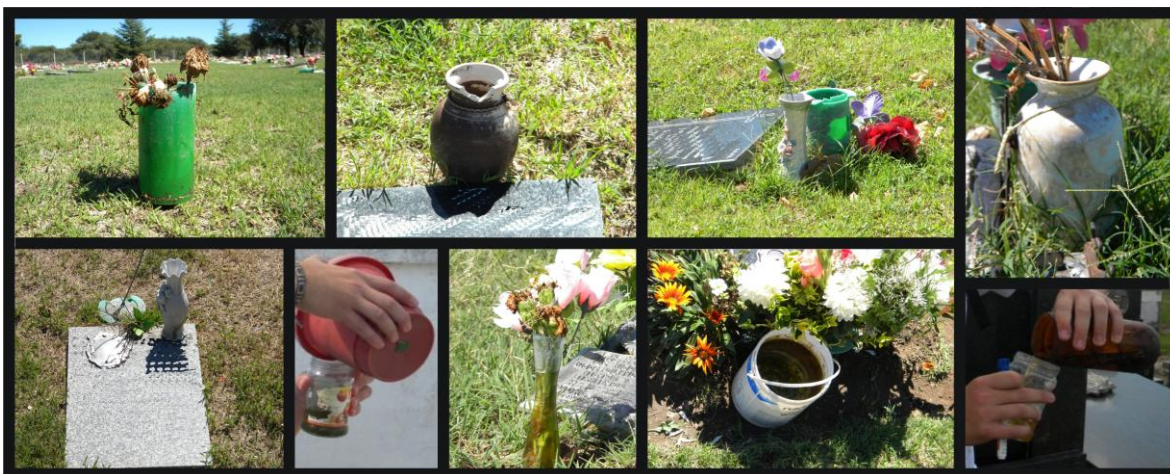


Imagen 1. Criaderos Artificiales en cementerios.



Imagen 2. Criaderos artificiales en depósitos de neumáticos.



Imagen 3. Colador cuadrado de 12 cm x 12 cm de lado.



Imagen 4. Criadero artificial en cementerio de volumen mayor a 200 l.



Imagen 5. Recipientes de 70 ml. para transporte de balsas.

4.3 LARVAS

4.3.1 Cría

Las larvas fueron criadas separadamente, las provenientes del cementerio y de los depósitos de neumáticos de cada localidad, en recipientes de 1500 ml. de volumen y con 750 ml. de agua libre de cloro en cada uno (Imagen 6). Estas fueron alimentadas con 150 mg. y 200 mg. de alimento balanceado para pollo BB molido (Alimentos Balanceados Vitabull S.A.C.I.A.), las condiciones en la cámara de cría se mantuvieron a una temperatura de $25 \pm 4^{\circ}\text{C}$ y un fotoperiodo de 14:10 hs luz/oscuridad, una vez realizada la muda de cuarto estadio se colectaron las exuvias y fueron depositadas en tubos tipo Eppendorf en alcohol 80% rotulados con la localidad de origen, tipo de criadero (florero, candelabro, etc. de cementerio o depósito de neumático) y fecha de recolección, para luego realizar las correspondientes mediciones (Índice del Sifón). Antes de la emergencia de los adultos, se separaron las pupas en recipientes de 500 ml dichos recipientes presentaban la boca cubierta con tela mosquitera para facilitar la manipulación de los adultos y su sacrificio a una temperatura de -20°C para realizar la extracción de la genitalia.

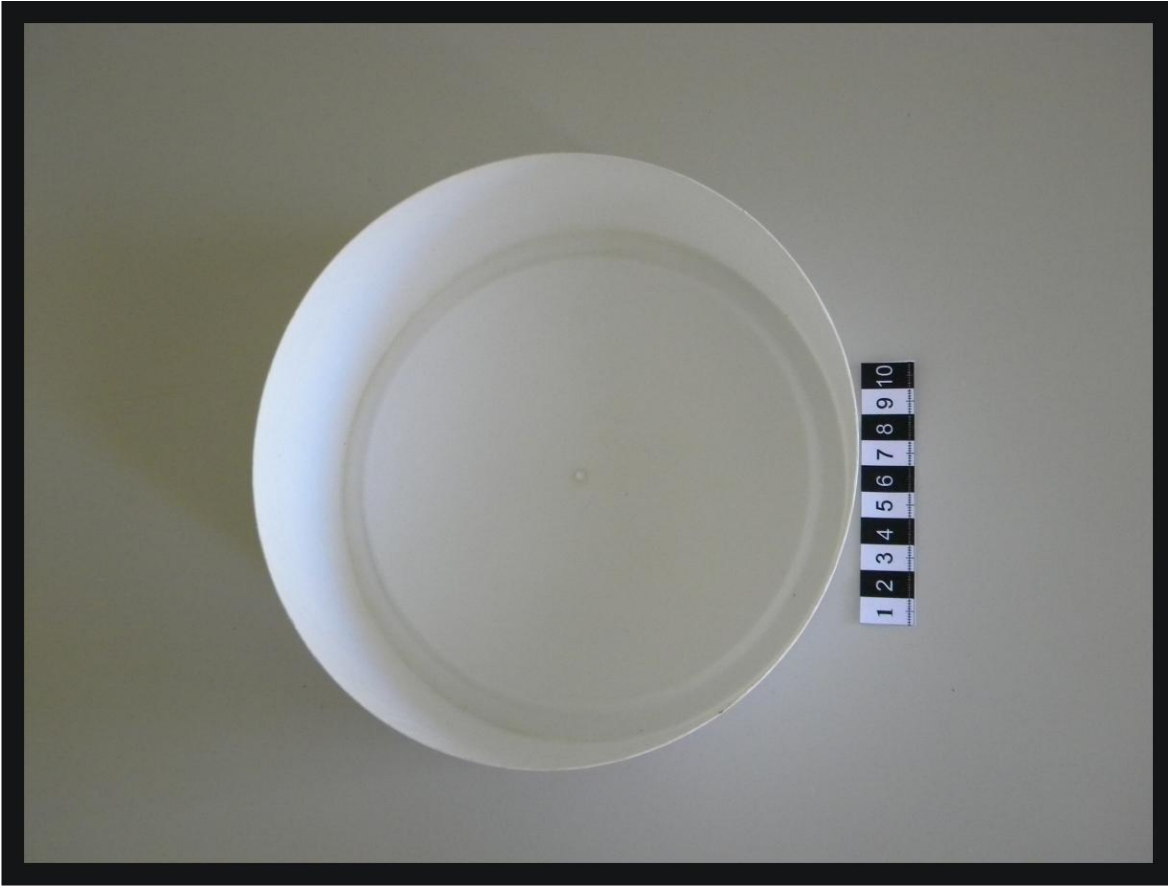


Imagen 6. Recipientes de 1500 ml de volumen.

4.3.2 LARVA: Obtención del Índice del Sifón de larvas

El carácter morfológico medido en exuvias de larvas cuarto estadio fue el sifón, para obtener el I. S., mediante la técnica de Brogdon (1981, 1984) modificada. El I. S. consiste en la relación, es decir, se divide el largo que comprende desde la base al ápice del sifón sobre la cara dorsal (sin tener en cuenta el aparato espiracular, ni las valvas espiraculares) y el ancho del sifón (tomado en su base, a 90° con respecto a la media anteriormente tomada), Para efectuar las mediciones del Índice del sifón (I.S.) las exuvias fueron extraídas con pipetas plásticas de boca ancha tipo Pasteur, para evitar dañar el sifón, estas fueron depositadas sobre un portaobjeto y se agregó una gota de alcohol 96 % cada 1 minuto aproximadamente mientras se realizaba las mediciones, para evitar que se evapore por completo el alcohol de la muestra, así impidiendo el colapso del sifón y la alteración del I.S.. Todas las mediciones se realizaron con microscopio estereoscópico Kyowa72 X de

aumento con ocular milimetrado (Imagen 7). Una vez finalizada las mediciones sobre la exuvia se es colocó nuevamente en alcohol 80% dentro de su correspondiente recipiente rotulado.



Imagen 7. Medición del Índice del sifón.

4.4 ADULTO: Obtención del Índice Morfométrico de la genitalia masculina

Todas las larvas capturadas fueron criadas hasta la emergencia de los adultos, de los cuales se extrajo la genitalia en los machos para calcular el índice morfométrico DV/D.

El índice DV/D consiste en la división entre la distancia entre los brazos ventrales y dorsales del phallosoma de un mismo lado (DV) y la distancia entre los brazos dorsales del phallosoma (V). Los pasos seguidos para realizar extracción y acondicionamiento de la genitalia necesarios en el cálculo del índice DV/D, fueron los siguientes:

1. Corte: Se cortó el abdomen de los machos adultos entre el VI y VII segmento abdominal con una tijera.(Imagen 8)

2. Clarificación: la porción distal del abdomen (V, VI, VII y VIII segmentos abdominales y la genitalia), fueron colocados en una solución de hidróxido de potasio al 10% durante 12 horas para aclararlos. (Imagen 9)
3. Lavado: luego se los retiró con una pipeta tipo Pasteur y colocó dentro de vidrio reloj durante 5 minutos, con agua destilada para lavar y eliminar toda la sal (KOH). (Imagen 10)
4. Deshidratación: como un paso preliminar a la medición, se deshidrató la genitalia pasándola por soluciones crecientes de alcohol, en caso de que hayan quedado cristales de hidróxido de potasio junto a la genitalia. Luego de deshidratarla se repitió el paso 3 y luego volvió a deshidratar. (Imagen 11)
5. Extracción de la genitalia: con dos minucias entomológicas y microscopio estereoscópico, se separó la genitalia del V y VI segmentos y se conservó junto a ésta el segmento IX. (Imagen 12)

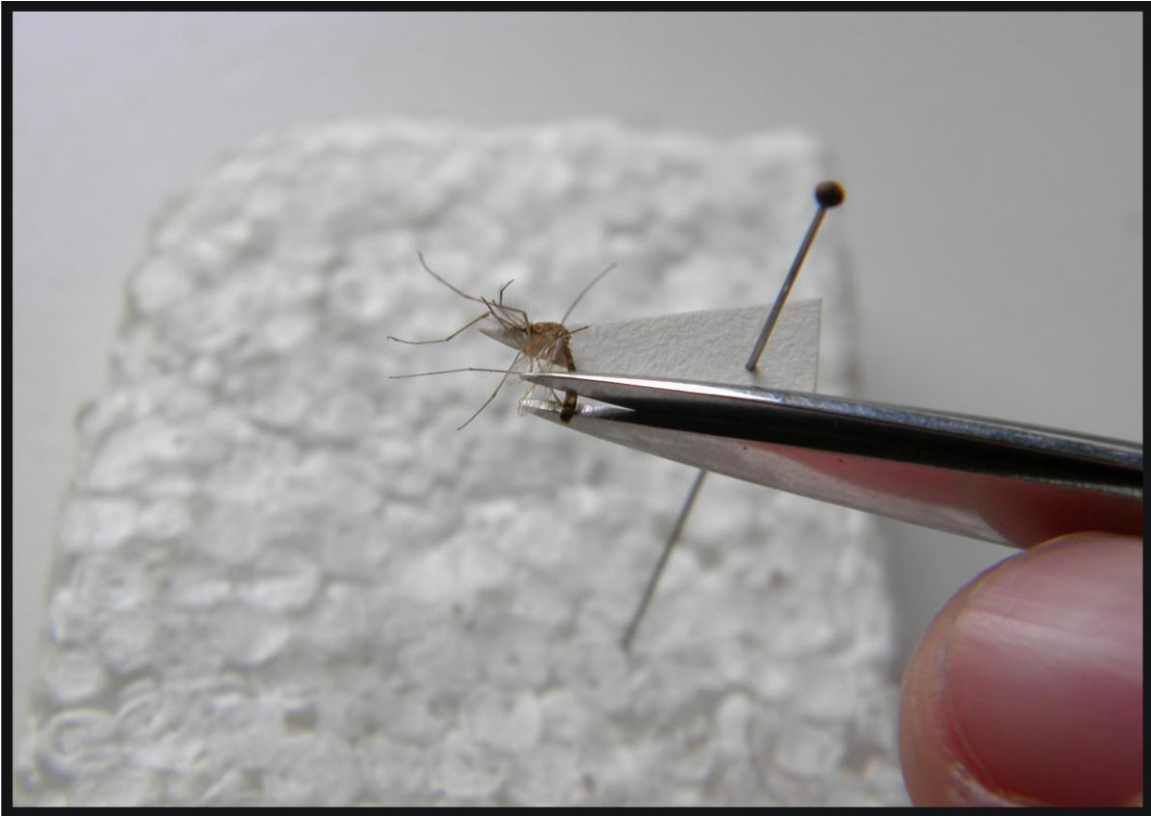


Imagen 8. Primer paso en la confección de la genitalia de macho. Corte entre el VI y VII segmento abdominal.

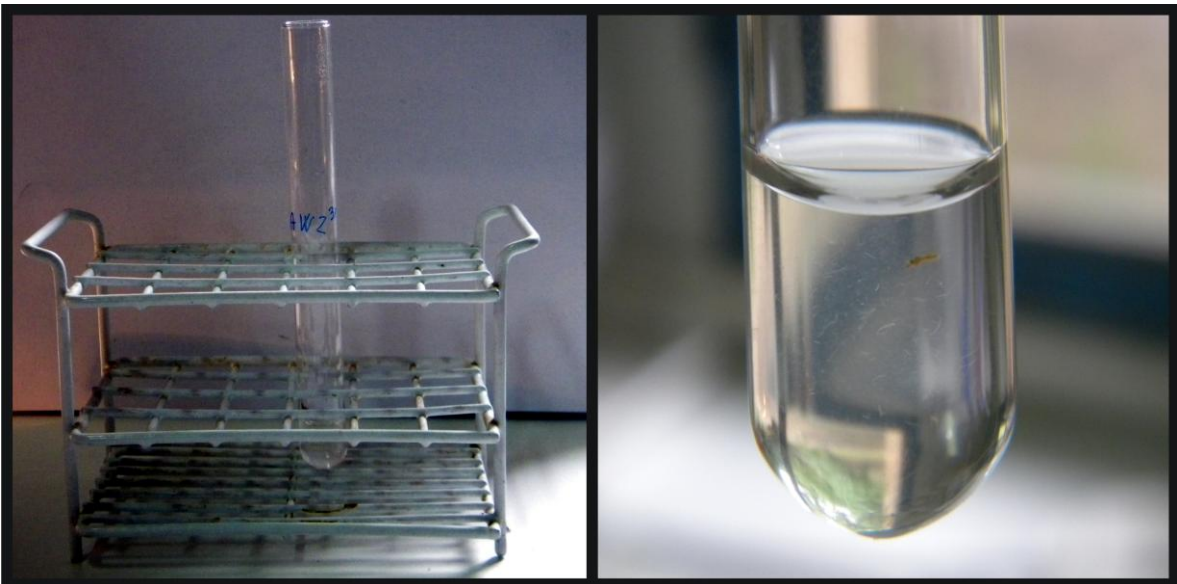


Imagen 9. Porción distal del abdomen en solución de hidróxido de potasio al 10%.

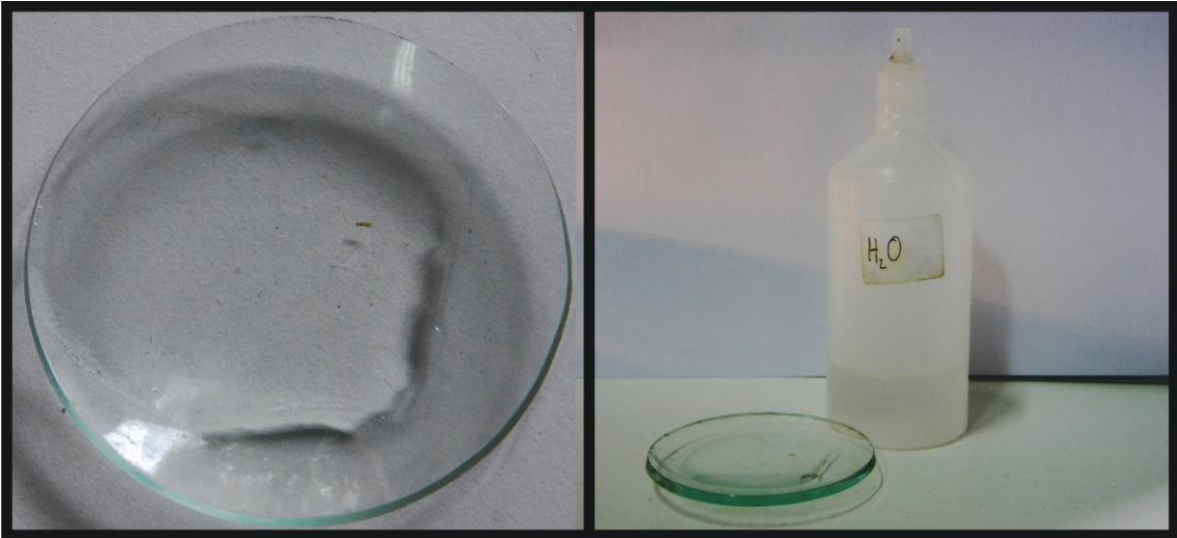


Imagen 10. Porción distal del abdomen inmerso en agua dentro de vidrio de reloj.

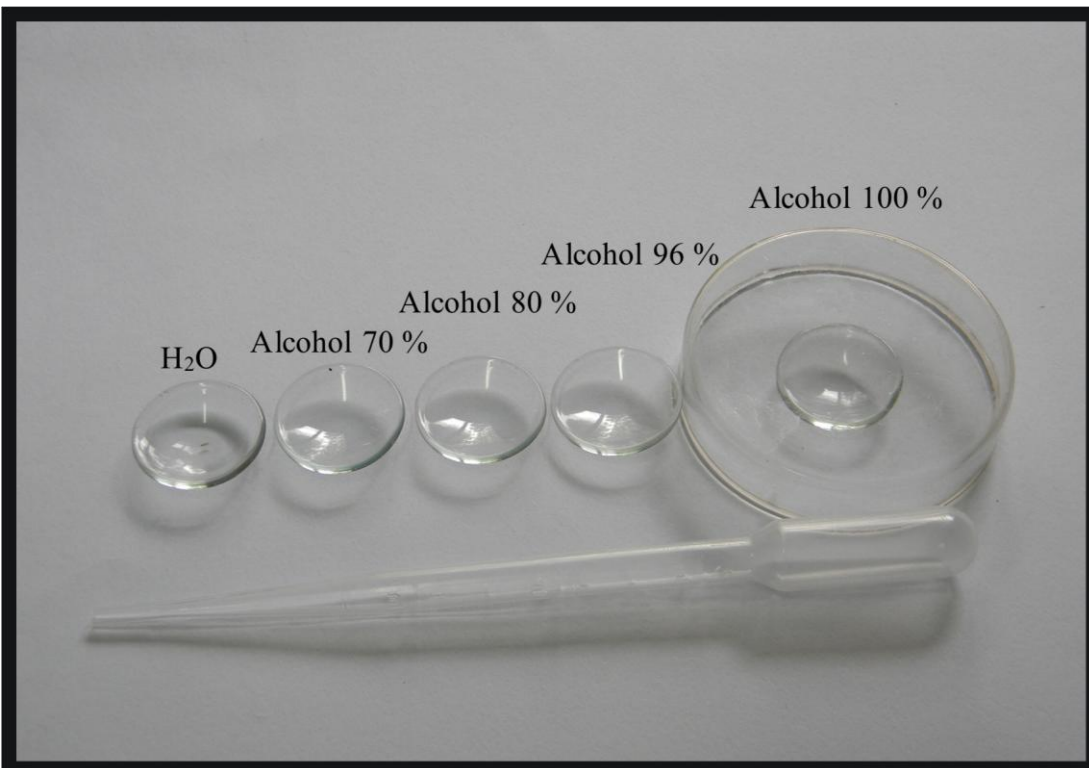


Imagen 11. Deshidratación de la genitalia de macho atreves de soluciones crecientes de alcohol.



Imagen 12. Separación de la genitalia del V, VI, VII y VIII segmentos abdominal.

Luego se colocó a la genitalia sobre un portaobjeto y se le añadió cada 1 minuto aproximadamente una gota de alcohol al 96% mientras se realizaban las mediciones, para evitar que se evapore por completo el alcohol de la muestra, así impidiendo la retracción y alteración de los brazos ventrales y dorsales y el DV/D respectivamente (Imagen 13) Las mediciones se realizaron con un microscopio Nikon YS 100 Luego se conservaron en tubos tipo Eppendorf en alcohol 80% correctamente rotulados. (Imagen 14)

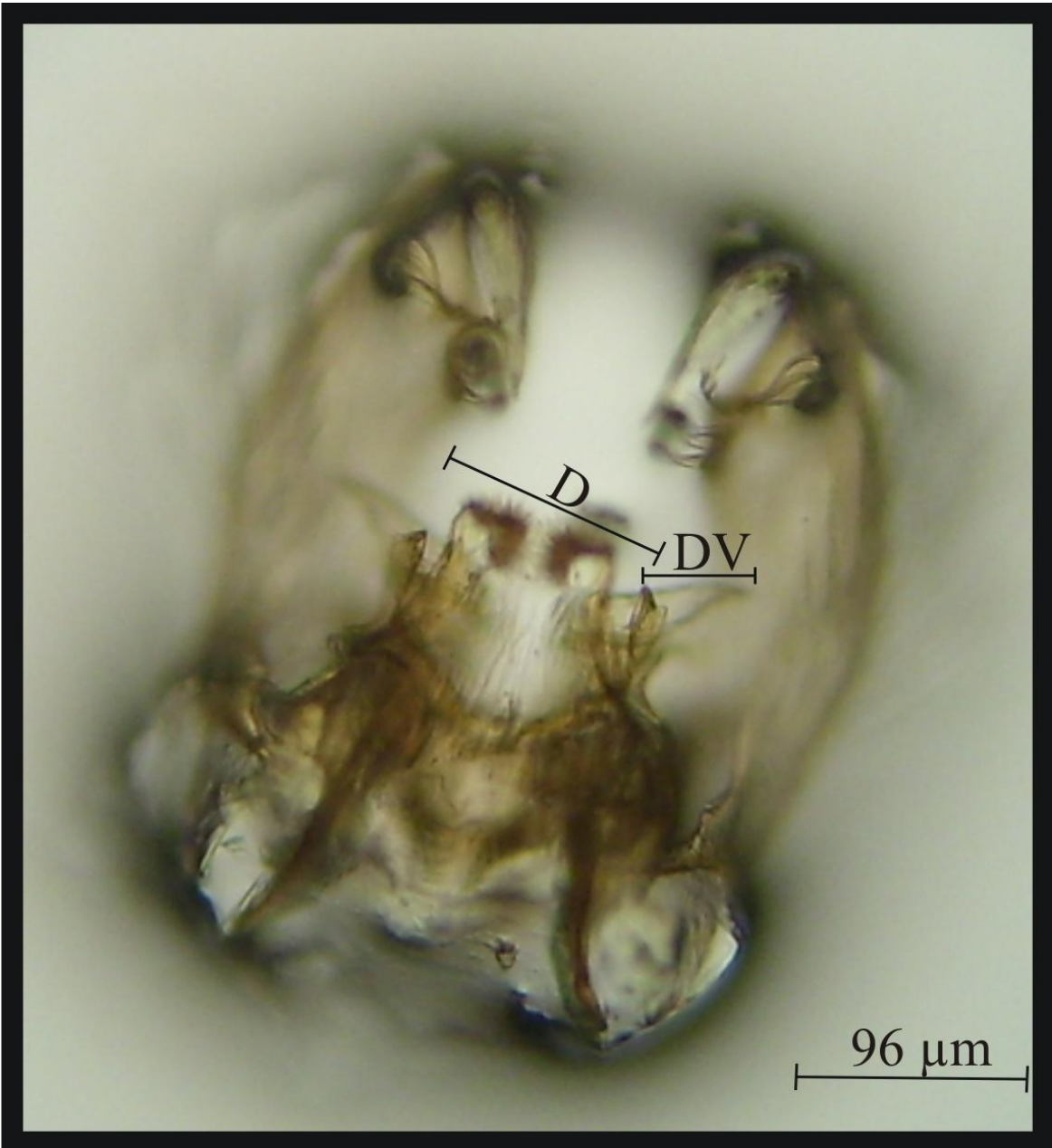


Imagen 13. Medición del índice morfométrico DV/D.



Imagen 14. Genitalia de machos en tubos tipo Eppendorf con alcohol 80% correctamente rotulados.

4.4.1 Prueba de Cruzamiento en cámara de cría

Los cruzamientos que se llevaron a cabo en el presente trabajo, fueron realizados con balsas colectadas en Realicó ($-35^{\circ} 1' 59''$, $-64^{\circ} 14' 30''$), donde se recolectaron en mayor cantidad, lo que permitiría reponer los individuos que perecían antes de efectuarse las correspondientes cruza. Las larvas de cada balsa recolectada fueron criadas con la metodología anteriormente descrita hasta llegar al estado de pupa, separando y asociando cada exuvia con la pupa correspondiente, luego los adultos que emergieron de estas pupas fueron procesados con la técnica anteriormente descrita. La caracterización a nivel

específica de cada cohorte se llevó a cabo mediante los índices DV/D y Sifonal de los primeros 5 adultos machos que emergieron y cinco exuvias del cuarto estadio larval elegidas al azar, la sexualidad de la pupas se las determinó por medio del tamaño de la genitalia utilizando microscopio estereoscópico. Una vez clasificadas las pupas por especie y sexo fueron introducidas en recipientes de 500 ml con agua declorada dentro de las jaulas de 30 x 30 x 30 cm. (Imagen 15) situadas en cámara de cría donde las condiciones especificadas anteriormente, agrupándolas de manera correcta para llevar a cabo los siguientes cruzamientos:



Imagen 15. Jaulas de cría de 30 x 30 x 30 cm..

Jaula N° 1 = C1=	♂ <i>Cx. quinquefasciatus</i>	X	♀ <i>Cx. pipiens</i>
	Realicó		Realicó
	F1	X	F1
	F2	X	F2
Jaula N° 2 = C2=	♂ <i>Cx. quinquefasciatus</i>	X	♀ <i>Cx. quinquefasciatus</i>
	Realicó		Realicó
Jaula N° 3 = C3=	♂ <i>Cx. pipiens</i>	X	♀ <i>Cx. pipiens</i>
	Realicó		Realicó
Jaula N° 4 = C4=	♂ <i>Cx. pipiens</i>	X	♀ <i>Cx. quinquefasciatus</i>
	Realicó		Realicó
	F1	X	F1

Los adultos una vez emergidos fueron alimentados con pasas de uvas cortadas por la mitad, durante tres días y luego se les ofreció sangre humana para suplir sus requerimientos de proteínas en la oviposición, luego las balsas fueron apartadas y criadas de manera similar a la anteriormente descrita, luego se calculó el I.S. y el DV/D a las exuvias larvales del cuarto estadio y genitalia masculina respectivamente.

Imagen

5 RESULTADOS

5.1 Búsqueda, captura y caracterización

A pesar de las condiciones húmedo-seco de la Región oriental de la provincia de La Pampa, (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria Provincia de La Pampa, Universidad Nacional de La Pampa, 2004) en todas las localidades muestreadas se pudo recolectar material biológico y también se observó una alta disponibilidad de criaderos artificiales tanto en gomerías como en los cementerios. Además se pudo observar que los criaderos artificiales presentaban más de una balsa de huevos y a la hora caracterizar estas balsas se pudo apreciar que un solo recipiente se encontraban individuos pertenecientes tanto a *Culex pipiens* como *Culex quinquefasciatus* o sus híbridos (Imagen 16), por lo tanto la

caracterización por medio del I.S. y DV/D se llevó a cabo en cada uno de los individuos y no por la caracterización de la cohorte, en caso donde se encontró una balsa de huevos sin eclosionar, si se la caracterizó por medio de un numero representativo de individuos.



Imagen 16. A) Genitalia macho *Culex pipiens*. B) Genitalia macho *Culex quinquefasciatus*. C) Genitalia macho Híbrido entre *Culex pipiens* y *Culex quinquefasciatus*.

5.2 Caracteres etológicos observados

Durante el periodo en el que se llevó a cabo el trabajo, se observó la posibilidad de autogenia por parte de las hembras que fueron utilizadas para realizar las cruces de pruebas. Siendo detectado este carácter etológico en hembras de la F2 de híbridos entre hembras de *Culex quinquefasciatus* y machos de *Culex pipiens*, los cuales ovipusieron 8 balsas o jangadas a los 8 días de emerger los adultos sin haber sido alimentados. La viabilidad y supervivencia de estos huevos y sus correspondientes larvas fue muy alta ya que solamente perecieron tres de éstas, una en estadio III y dos en estadio IV. También se registró autogenia en una hembra perteneciente a un cohorte de *Culex pipiens*, que ovipuso una balsa a los 13 días del nacimiento, al igual que el resto de los demás adultos fueron alimentados con pasas de uvas y no se les ofreció sangre para ingerir.

5.3 Caracteres morfológicos

5.3.1 Índice DV\D de adultos colectados en campo

Tabla 3. Presencia del complejo *Culex pipiens* en cinco localidades de la provincial de La Pampa, identificados mediante índice DV\D en genitalia de machos, capturados en estadio larval. (Febrero, Marzo 2010)

Localidades		<i>Culex pipiens</i>	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Híbridos	Total
Santa Rosa	n	10	80	8	98
	%	10,6 %	81,6 %	7,8 %	100 %
Winifreda	n	38	10	0	48
	%	79 %	21 %	0 %	100 %
Castex	n	84	22	4	110
	%	76,4 %	20 %	3,6 %	100 %
Gral. Pico	n	1	12	35	48
	%	2 %	73 %	25 %	100 %
Realicó	n	59	94	8	161
	%	37,1 %	58 %	4,9 %	100 %

5.3.2 Índice del sifón de larvas colectadas en campo

La técnica empleada por Brogdon 1984 y 1981 para calcular el I.S, toma el ancho del sifón aproximadamente en la porción medial del sifón donde este es más ancho pero el criterio de cuál es el punto de mayor curvatura es arbitrario, esto puede generar que una misma muestra sea identificada de manera desigual por diferente técnico, al tomar la base como ancho del sifón se estandariza la técnica, pero esto modifica el rango de I.S. específico para cada componente del complejo *Culex Pipiens*, por este motivo se identificó a través del índice DV\D una cohorte de *Culex quinquefasciatus* y otra de *Culex pipiens*, se calculó la media y el desvío estándar del I.S. de las exuvias de cada uno de estas cohortes y luego se construyó un intervalo, en donde la resta de la media y el desvío estándar es el extremo

hacia los negativos y la sumatoria de la media y el desvío estándar es el extremo opuesto (Fig. 7). Así los I.S. calculados de las muestras de campo que caigan en uno u otro intervalo serán clasificados según corresponda y los valores intermedios como híbridos. El porcentaje de especímenes pertenecientes al complejo *Culex* Pipiens caracterizados mediante el I.S. se presentan en la (Tabla 4).

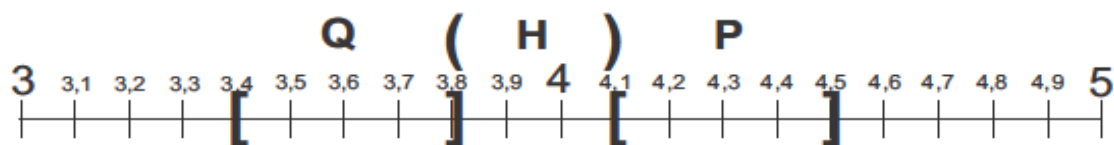


Fig. 7 Rango I.S. de *Culex pipiens quinquefasciatus*, *Culex pipiens pipiens* e híbridos. (Febrero, Marzo 2010)

Tabla 4. Presencia del complejo *Culex* Pipiens en cinco localidades de la provincia de La Pampa, identificado mediante I.S. en larvas cuarto de cuarto estadio. (Febrero, Marzo 2010)

Localidades		<i>Culex pipiens</i>	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Híbridos	Total
Santa Rosa	n	17	65	23	105
	%	16 %	62 %	22 %	100 %
Winifreda	n	171	46	28	245
	%	70 %	19 %	11 %	100 %
Castex	n	110	52	70	232
	%	48 %	22 %	30 %	100 %
Gral. Pico	n	25	76	28	129
	%	19 %	59 %	22 %	100 %
Realicó	n	78	112	49	161
	%	33 %	47 %	420 %	100 %

5.4 Cruzamientos de Prueba

5.4.1 Análisis estadístico del índice I.S.

Los cruzamientos realizados para la obtención de cohortes puras de *Culex quinquefasciatus*, *Culex pipiens*, así como sus híbridos fue totalmente factible. La Tabla 6 presenta los valores del análisis estadístico básico con medias, desvío estándar, máximo y mínimo para el índice DV\D en las diferentes cruces y filiales de la misma

El test de normalidad aplicado (Shapiro-Wilk) indicó que una de las muestras no sigue una distribución normal a un nivel de significancia del 5% (muestra color rojo). Por lo tanto se procedió a analizar los datos mediante un test no paramétrico (Kruskal-Wallis), por medio del cual se determinó que las medianas de cada muestra son diferentes significativamente a un nivel de significancia del 5% con una significancia asintótica o un valor de $P = ,000$. Luego se aplicó el test de Dunn, dando como resultado que hay diferencia a un nivel de significancia del 0,4166% para las medianas de los I.S. entre siguientes los cruces (comparación de muestras en color rojo):

1) C1 y C3,

1) C2 y C3,

2) C3 y C4.

Donde:

C1 = ♂ *Cx. quinquefasciatus* X ♀ *Cx. pipiens*

C2= ♂ *Cx. quinquefasciatus* X ♀ *Cx. Quinquefasciatus*

C3= ♂ *Cx. pipiens* X ♀ *Cx. pipiens*

C4= ♂ *Cx. pipiens* X ♀ *Cx. quinquefasciatus*

En el resto de las diferentes combinaciones de comparación entre cruzamientos, no presentaron diferencia significativa.

Tabla 5. Estadística descriptiva del I.S. de los cruzamientos de prueba y del I.S. de las localidades muestreadas. (Febrero, Marzo 2010).

Cruza		Largo	Ancho	I.S	I.S. Promedio	Desvío Estándar	n
<i>Cx. pipiens</i>	Max	1495 µm	345 µm	4,6	4,3	0,25	15
	Min	1311 µm	299 µm	3,8			
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	Max	1288 µm	368 µm	4,3	3,6	0,29	42
	Min	1035 µm	276 µm	3,1			
C1	Max	1518 µm	391 µm	4,3	3,9	0,28	56
	Min	1150 µm	276 µm	3,1			
C2	Max	1403 µm	368 µm	4,3	3,8	0,22	47
	Min	1150 µm	322 µm	3,1			
C3	Max	1380 µm	322 µm	4,6	4,3	0,31	17
	Min	1058 µm	276 µm	3,7			
C4	Max	1357 µm	345 µm	4,2	3,7	0,29	26
	Min	1081 µm	299 µm	3,1			
Santa Rosa	Max	1334 µm	345 µm	5,5	3,7	0,35	146
	Min	805 µm	207 µm	3,1			
Winifreda	Max	1596 µm	378 µm	6,3	4,3	0,54	245
	Min	840 µm	210 µm	2,8			
Castex	Max	1663 µm	414 µm	5	4,1	0,39	151
	Min	989 µm	252 µm	2,8			
Gral. Pico	Max	1357 µm	391 µm	6	3,8	0,43	129
	Min	920 µm	253 µm	3			
Realicó	Max	1610 µm	391 µm	5,3	3,9	0,36	239
	Min	920 µm	253 µm	3			

Pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk. (gl. = grados de libertad. Sig. = Significancia).

Cruzamiento		Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl.	Sig.
I.S	C1	,974	14	,930
	C2	,930	41	,014
	C3	,901	17	,070
	C4	,962	26	,435

Prueba de Kruscal-Wallis.(gl.= grados de libertad)

Variable de agrupación: Cruzamiento

	I.S
Chi cuadrado	25,028
gl	3
Sig. asintót.	,000

Post-Test de Dunn.

$$\alpha = 0,004166$$

$$1-\alpha = 0,995834$$

$$2,6383115$$

$$Z_{1-\alpha} = 3$$

$$n = 98$$

	n_j	41	17	26
n_i		C2	C3	C4
14	C1	23,225	27,079	24,872
41	C2		21,644	18,81
17	C3			23,402

	R_j	43,67	80,68	43,23
R_i		C2	C3	C4
40,36	C1	3,31	40,32	2,87
43,67	C2		34,99	0,44
80,68	C3			37,45

5.4.2 Análisis estadístico del índice DV\D

La Tabla 6 presenta los valores del análisis estadístico básico con medias, desvío estándar, máximo y mínimo para el índice DV\D en las diferentes cruzas y filiales de la misma. Los valores se corresponden correctamente con la bibliografía consultada.

El test de normalidad aplicado (Shapiro-Wilk) indicó que una de las muestras sí presentan una distribución normal a un nivel de significancia del 5%, pero el test de Levene comprueba que no presentan homocedasticidad de varianza a un nivel de significancia del 5%, por este hecho se seguirá aplicando el test no paramétrico (Kruskal-Wallis), por medio del cual se determinó que las medianas de cada muestra son diferentes significativamente con un nivel de significancia del 5% y con una significancia asintótica o un valor de $P = ,000$. Luego se aplicó el test de Dunn, dando como resultado que hay diferencia a un nivel de significancia del 0,4166% para las medianas de los DV/D de todas las muestras (comparación de muestras en color rojo), a excepción de la comparación entre el cruzamiento C4 y C1, el cual no presentó diferencia significativa.

Tabla 6. Estadística descriptiva del DV/D de los cruzamientos de prueba y del DV/D de las localidades muestreadas. (Febrero, Marzo 2010).

Cruza		DV	D	DV/D	DV/D Promedio	Desvio Estandar	n
<i>Cx. pipiens</i>	Max	19 μm	144 μm	0,07	0,06	0,05	7
	Min	0 μm	125 μm	0			
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	max	67 μm	86 μm	1,2	0,8	0,18	17
	Min	48 μm	48 μm	0,6			
C1	Max	48 μm	144 μm	0,5	0,3	0,09	40
	Min	19 μm	96 μm	0,2			
C2	Max	87 μm	86 μm	1,1	0,9	0,11	17
	Min	58 μm	48 μm	0,7			
C3	Max	14 μm	154 μm	0,1	0,06	0,03	21
	Min	0 μm	115 μm	0,03			
C4	Max	48 μm	125 μm	0,5	0,3	0,05	21
	Min	29 μm	87 μm	0,3			
Santa Rosa	Max	87 μm	154 μm	1,6	0,7	0,4	98
	Min	8 μm	48 μm	0,06			
Winifreda	Max	77 μm	192 μm	1,6	0,2	0,4	48
	Min	0 μm	58 μm	0			
Castex	Max	67 μm	154 μm	1,4	0,1	0,2	110
	Min	0 μm	48 μm	0			
Gral. Pico	Max	77 μm	116 μm	1,1	0,5	0,1	48
	Min	29 μm	48 μm	0,2			
Realicó	Max	87 μm	154 μm	1,8	0,5	0,4	161
	Min	0 μm	29 μm	0			

Pruebas de normalidad

Cuzamientos		Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.
DVD	C1	,922	10	,378
	C2	,940	17	,314
	C3	,933	21	,160
	C4	,948	21	,315

Prueba de homogeneidad de varianzas (gl. = grados de libertad. Sig. = Significancia).

DVD

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
11,863	3	65	,000

Prueba de Kruskal-Wallis_{a-b} (gl. = grados de libertad. Sig. Asintót. = Significancia asintótica).

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: Cruzamientos

	DVD
Chi cuadrado	59,013
gl	3
Sig. asintót.	,000

Post-Test de Dunn

$\alpha = 0,0041666$

$1-\alpha = 0,995834$

$Z_{1-\alpha} = 2,63831153$

$n = 69$

	n_j	17	21	21
n_i		C2	C3	C4
10	C1	21,0939	20,3363	20,3363
17	C2		17,2686	17,2686
21	C3			16,3345

	R_j	61	11	37,21
R_i		C2	C3	C4
36,55	C1	24,45	25,55	0,66
61	C2		50	23,79
11	C3			26,21

6 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

6.1 Detección de autogenia

La autogenia es la capacidad de realizar oviposición sin ingesta de sangre previa, lo cual es característico en algunas especies de culícidos, dicha capacidad, influyen en ciertos factores, como por ejemplo, ahorro del tiempo de búsqueda de hospedador, la probabilidad de morir accidentalmente durante la ingesta de sangre, relación en tiempo de duración de estadios inmaduros con respecto al adulto, etc., que afectan en forma positiva la supervivencia de la especie que la porta, además de presentar un ahorro energético.

Culex pipiens forma *molestus* se diferencia de la forma *pipiens* por presentar esta cualidad. En la Argentina este carácter eco-fisiológico fue detectado en poblaciones provenientes de La Plata, Chubut y Río Negro (Vinogradova, 2003; Mitchell, 1984; Pascual, 2004)

-En el presente trabajo se registró autogenia en poblaciones de *Culex pipiens* caracterizadas por medio del índice DV\D tomando valores entre 0 y 0,2 provenientes de la localidad de Realicó y Santa Rosa, oviponiendo una y dos balsas respectivamente. También se pudo registrar la oviposición de 8 balsas sin ingesta previa de sangre por parte de la F3 de híbridos obtenidos en laboratorio a partir de la cruce "C1".

6.2 Detección del complejo *Culex Pipiens* en el noreste de la provincia de La Pampa

El complejo *Culex Pipiens* en la Argentina está representado por dos integrantes *Culex pipiens* y *Culex quinquefasciatus* (Almirón *et al.*, 1995; Darsie, 1985), que se diferencian por las características morfológicas y etológicas anteriormente descritas. La distribución de estas dos especies en la Argentina está bien diferenciada, donde *Culex pipiens* está registrado para la provincia de Mendoza, San Juan, Buenos Aires, Río Negro, Neuquén, Chubut y Santa Cruz, el extremo norte de su distribución estaría comprendido entre la latitud 35° y 34°. A diferencia *Culex quinquefasciatus* que está registrado para las siguientes Provincias: Buenos Aires, Catamarca, Chaco, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, La Rioja, Misiones, Salta, Santa Fe, Santiago del Estero y Tucumán, donde el

extremo sur de su distribución estaría comprendido aproximadamente en la latitud 32°, es decir que la distribución de *Cx. pipiens* abarcaría la región sur de una línea imaginaria que corre entre Buenos Aires y Sur de la provincia de San Juan, siendo que *Cx. quinquefasciatus* se haría presente al norte de la misma (Mitchell *et al.*, 1984). Para la provincia de La Pampa, Carpintero y Leguizamón (2004) mencionan la ocurrencia de *Culex quinquefasciatus*, pero no especifican estado, sexo y estadio del/los ejemplar/es capturado/s, así como también la técnica utilizada para la identificación. En lo que respecta a formas híbridas, Brewer *et al.*, (1987) menciona su presencia en Quebracho Flojo (Río Seco), Córdoba capital y Huascha (Cruz de Eje, aproximadamente latitud 30° 36' S) en la provincia de Córdoba, comprendidos entre la latitud 30° S y 32° S, Almirón *et al.*, (1995) detalla la presencia de híbridos en ciudad de Rosario, provincia de Santa Fe, latitud 32° 56' S y Antunes de Morais *et al.*, (2010) en ciudad de La Plata, provincia de Buenos Aires, hasta la latitud 35° S. (Mitchell *et al.*, 1984; Almirón *et al.*, 1995; Pascual, 2004; Vinigradoba, 2003; Almirón y Brewer 1996; Antunes de Morais *et al.*, 2010).

-Por lo tanto, en el presente trabajo se da a conocer la presencia de *Culex quinquefasciatus* en la Provincia de La Pampa, especificando correctamente los índices morfométricos calculados.

-También se cita por primera vez a *Culex pipiens* en la Provincia de La Pampa.

-De acuerdo a lo expresado los registros de híbridos del Complejo Pipiens en la Argentina se localizan entre las latitudes 30° 36' S (Huascha) y 36° 37' S (Santa Rosa), y entre las longitudes 57° 57' O (La Plata) hasta 64° 48' O (Cruz del Eje), Hasta el momento, ya que no hay estudios realizados al Oeste de esa posición.

6.3 Pruebas de cruzamiento híbridos

-Los datos obtenidos a partir de los cruzamientos de prueba permiten afirmar la interfertilidad entre poblaciones de *Culex pipiens* y *Culex quinquefasciatus* provenientes de la provincia de La Pampa, considerarlos a ambos como sub especies bajo la definición biológica de especie, coincidente con la bibliografía consultada.

6.4 Caracteres morfológicos

-El I.S. no es una medida morfométrica apta para discriminar entre *Culex pipiens* y *Culex quinquefasciatus* así como sus formas intermedias si bien en la bibliografía consultada se menciona que puede haber ciertas diferencias entre los I.S. debido a las diferentes técnicas y técnicos que se emplean y/o realizan las mediciones respectivamente, es considerada una característica morfométrica apta para identificar a estos formas intermedias, el presente trabajo no coincide con esta posibilidad.

-A diferencia del I.S. el índice morfométrico DV/D es perfectamente apto para poder llevar a cabo la diferenciación entre *Cx. Pipiens* y *Cx. quinquefasciatus*, estando totalmente de acuerdo con la bibliografía consultada. Considerándose *Cx. pipiens* a los individuos con valores para el índice DV/D comprendidos entre 0 y 0,1, *Cx. quinquefasciatus* para valores comprendido entre 0,7 y 1 y formas intermedias para valores intermedios.

7 BIBLIOGRAFIA

- Almirón W. R. y Brewer M. M. 1995. Preferencia de hospedadores de Culicidae (Diptera) recolectados en el centro de la Argentina. *Saúde Pública*. Vol. 29(2):108-114.
- Almirón W. R., Humeres S.G. y Gardel C. N. 1995. Distributions and Hybridization between *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Argentina. *Inst. Oswaldo Cruz*. Vol. 90(4):469-473.
- Almirón W. R. y Brewer M. M. 1996. Classification of Immature Stage Habitats of Culicidae (Diptera) Collected in Córdoba, Argentina. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. Vol. 91(1): 1-9.
- Antunes de Morais S., Moratore C., Suesdek L. Toledo Marrelli M. 2010. Genetic-morphometric variation in *Culex quinquefasciatus* from Brazil and La Plata, Argentina. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. Vol. 105(5): 672-676
- Brogdon W. G. 1981. Use of the Siphonal Index to Separate *Culex pipiens* Subspecies and Hybrids. *Mosquito Systematics*. Vol. 13(2):129-137.
- Brogdon W. G. 1984. The Siphonal Index. A Method for Evaluating *Culex pipiens* Subspecies and Intermediates. *Mosquito Systematics*. Vol. 16(2):144-152.
- Bram, Ralph A.. 1967. Classification of *Culex* Subgenus *Culex* In the New World (Diptera: Culicidae). *Proc. U.S. Nat. Mus.* Vol. 120 (3557):1-122.
- Carpintero D.J. y Leguizamón M. N. 2004. Description of a new *Culex* (*Culex*) species (Diptera: Culicidae) from La Pampa Province, Argentina, and a preliminary list of the mosquitoes of the province. *Studia Dipterologica*. Vol. 11(2): 501-503.
- Darsie, R. F. Jr.. 1985. Mosquitoes of Argentine. *Mosquito Systematics*. Vol. 17:153-253.

- CSIRO. 1991. The Insects of Australia. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation. Cornell university press. Vol. II: 1137pp.
- Edwards, F. W. 1920. The Nomenclature of the Parts Of the Male Hypopygium of Diptera Nematocera, with special referente to Mosquitoes. Ann.Trop. Med. Parasitol.Vol. 14:23-40.
- Forattini O. P., de Castro Gomes A., Natal D., Kakitani I., Marucci D. 1987. Preferencias Alimentares de Mosquitos Culicidae no Vale do Ribeira, Sao Paulo, Brasil.Rev. Saúde Públ.Vol.21(3):171-187.
- Jakob W. L.; Francy D. B.; Mullenix J. & Taylor S. A.1980a. Further Studies on the *Culex pipiens* Complex in Memphis, Tennessee.Mosquito Systematics.Vol. 12(3):371-376.
- Jakob W. L.; Francy D. B. y Taylor S. A.1980b. Studie of Male Offpring From Overwintering *Culex pipiens* complex Mosquitoes.Mosquitos News.Vol. 40(4):523-526.
- Jakob W. L.; Taylor S. A. Francy D. B..1980c. Additional Studies of Male Progeny of Overwintering *Culex pipiens* Complex Mosquitoes from Memphis, Tennessee.Mosquito Systematics.Vol. 12(4):386-391.
- Jakob W. L. y Francy D. B. 1984. Observations on the DV/D Ratio of Male Genitalia of *Culex pipiens* Complex Mosquitoes in the United Status.Mosquito Systematics.Vol. 16(4):282-288.
- Harbach, Ralph E., Jakob W. L. y Peyton E. L.1986. Recognition of *Culex bidens* Dyar and *Culex interlfor* Dyar (Diptera: Culicidae) as separate species.Mosquito Systematics.Vol. 18 (2): 139-144.
- Knight, K. L. y Laffoon J. L.1971. A Mosquito Taxonomic Glossary.Mosq. Syst. Newsletter.Vol 3 (1):8-24.

- Mitchell, C. J., Darsie R. F., Jr. & Monath T. P. 1984. Occurrence of Autogenous *Culex pipiens* Linnaeus, 1758, (Diptera: Culicidae) in Argentina and Notes on Distribution of the Complex. *Mosquito Systematics*. Vol. 16 (4): 308-316.
- Pascual A. N. T. 2004. Morfología y Citogenética del Complejo *Culex (Culex) pipiens* L. 1758 (Diptera: Culicidae), presentes en Argentina. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones. 101pp.
- Petersen, Lyle R. y John T. Roehrig. 2001. West Nile Virus: A reemerging global pathogen. *Rev. Biomed.* Vol. 12: 208-216.
- Rossi G. C., Mariluis J. C., Schnack J. A. y Spinelli G. R. 2002. Dípteros vectores (Culicidae y Calliphoridae) de la provincia de Buenos Aires. COBIOBO 4. PROBIOTA 3. Publicart. La Plata, Argentina. pp. 45.
- Rossi G. C. y Almirón W. R. 2004. Clave ilustrada para la identificación de larvas de mosquitos de interés sanitario encontradas en criaderos artificiales en la Argentina. Fundación Mundo Sano. Monografía N° 5. Pp. 53.
- Service, M. W. 1996. *Medical Entomology*. Chapman & Hall. 278 pp.
- Vezzani Darío, Diego F. Eiras y Cristina Wisnivesky. 2006. Dirofilariasis in Argentina: Historical review and first report of *Dirofilaria immitis* in a natural mosquito population. *Veterinary Parasitology*. Vol. 136: 259-273.
- Vezzani D. y Carbajo A. E. 2008. *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and Dengue in Argentina: Current Knowledge and Future Directions. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. Vol. 103(1): 66-74.
- Vinogradova E. B. 2003. Ecophysiological and morphological variations in mosquitoes of the *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae). *Acta Soc. Zool. Bohem.* Vol. 67: 41-50.